

# **Konvergente Entwicklung der Infektionsmechanismen in den parasitären Pflanzen *Cuscuta reflexa* und *Phelipanche aegyptiaca***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl. Biol. Jan Rehker

aus Köln

Berichterstatter:(1. Referent): Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Heribert Warzecha

Tag der Einreichung: 04.10.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2012

Darmstadt 2012

# Inhalt

<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cuscuta .....	2
1.2 Orobanchaceae .....	4
1.3 Vorarbeiten .....	7
1.3.1 attAGP .....	7
1.3.2 Cuscutain .....	8
1.4 Ziele der Arbeit .....	9
<b>II. Ergebnisse .....</b>	<b>12</b>
1.1 Induktion des attAGP-Promotors durch Phelipanche in Tomatenpflanzen .....	12
1.2 Induktion des attAGP-Promotors durch Phytohormone und zellwandabbauende Enzyme.....	13
1.3 Analyse von Cysteinproteasen in <i>P. aegyptiaca</i> .....	15
1.3.1 Erstellung eines Transkriptoms von <i>P. aegyptiaca</i> .....	15
1.3.2 Ähnlichkeit von Cysteinproteasen aus <i>P. aegyptiaca</i> und <i>C. reflexa</i> ....	18
1.4 Expressionsanalyse von Transkripten aus <i>P. aegyptiaca</i> .....	20
1.4.1 Expressionsanalyse von Cysteinproteasen in <i>P. aegyptiaca</i> .....	22
1.5 Transformation von Tabak mit PrePropeptid-Konstrukten .....	23
1.6 Infektion des transformierten Tabaks durch Cuscuta.....	25
1.7 Infektion durch Phelipanche im <i>in vitro polybag</i> -System .....	26
1.7.1 Keimung der Phelipanchesamen .....	26
1.7.2 Infektion und Tuberkelbildung .....	27
1.7.3 Anfälligkeit der Tabakpflanzen gegenüber Phelipanche in Erde .....	30
<b>III. Diskussion .....</b>	<b>33</b>
1.1 Induktion des attAGP-Promotors .....	33
1.1.1 Induktion des attAGP-Promotors durch Phelipanche .....	33
1.1.2 Induktion des attAGP-Promotors durch Phytohormone.....	34
1.2 Analyse von Cysteinproteasen in <i>P. aegyptiaca</i> .....	35

1.3 Überprüfung der Zuordnung der Sequenzierungsdaten zu Phelipanche oder Arabidopsis cDNA.....	36
1.4 Expression von Cysteinproteasen aus <i>P. aegyptiaca</i> .....	37
1.5 Effekt des PrePropeptids auf die Infektion durch <i>Cuscuta</i> .....	38
1.6 Wirkung des PrePropeptids auf Phelipanche.....	38
<b>IV. Ausblick.....</b>	<b>41</b>
<b>V. Material und Methoden .....</b>	<b>43</b>
1.1 Arbeiten mit Pflanzen.....	43
1.1.1 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	43
1.1.2 <i>Cuscuta reflexa</i> .....	43
1.1.3 <i>Phelipanche aegyptiaca</i> .....	44
1.1.4 <i>Solanum lycopersicum</i> .....	44
1.1.5 <i>In vitro polybag</i> -System .....	44
1.1.6 Applikation von Faktoren zur Induktion des attAGP-Promotors .....	46
1.2 X-Gluc-Färbung.....	46
1.3 Arbeiten mit Bakterien.....	47
1.3.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> .....	47
1.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Heat shock.....	47
1.3.3 Arbeiten mit <i>A. tumefaciens</i> .....	48
1.3.4 Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mittels freeze thaw Methode.....	48
1.3.5 Kryokonservierung von Bakterien .....	48
1.3.6 Transformation von Tabak mittels <i>A. tumefaciens</i> .....	49
1.4 Molekularbiologische Methoden .....	50
1.4.1 Isolation von Gesamt-DNA aus Pflanzen .....	50
1.4.2 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	51
1.4.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	52
1.4.4 PCR .....	52
1.4.5 Restriktionsabbau .....	53
1.4.6 Ligation von Fragmenten in Plasmidvektoren.....	53
1.4.7 Sequenzierung von DNA .....	54
1.5 RNA.....	54

1.5.1 Gesamt-RNA Isolation.....	54
1.5.2 Auftrennung von RNA im MEN-Agarosegel.....	55
1.5.3 Northern Blot .....	56
1.6 Bioinformatische Methoden .....	58
1.6.1 Assembly eines Transkriptoms von <i>P. aegyptiaca</i> .....	58
1.6.2 Alignment der Sequenzdaten .....	59
1.6.3 Verarbeitung der Rohdaten .....	60
1.6.4 Zählen der reads in den Alignments .....	64
1.6.5 Elektronische Datenverarbeitung.....	65
<b>VI. Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>VII. Literatur .....</b>	<b>68</b>
<b>VIII. Anhang.....</b>	<b>75</b>

## **I. Einleitung**

Parasitäre Pflanzen sind in der Lage, Wirtspflanzen zu befallen und ihnen sowohl Flüssigkeit als auch Assimilate zu entziehen. Dies schädigt die Wirtspflanzen und kann unter Umständen bis zu deren Absterben führen. Morphologische Gemeinsamkeit und Grundlage für die parasitäre Lebensweise ist das sogenannte Haustorium. Dieses Organ entsteht durch Einwachsen der parasitären Pflanze in das Wirtsgewebe, wobei eine Verbindung zwischen den Leitbündeln von Parasit und Wirt hergestellt wird. Hier differenziert man, je nachdem was für ein Wirtsorgan infiziert wird, zwischen Wurzel- und Sprossparasiten (Kollmann & Dörr 1987). Bei parasitären Pflanzen können unterschiedliche Organe ein oder mehrere Haustorien ausbilden. In vielen parasitären Pflanzenarten übernimmt die Keimwurzel diese Funktion. Verbreitete Beispiele hierfür sind die Gattung der Misteln (*Viscum*) und die Familie der Sommerwurzgewächse (*Orobanchaceae*). Seltener ist die Ausbildung von Haustorien aus dem Spross wie sie bei der Gattung der Seiden (*Cuscuta*) zu beobachten ist. Der Grad des Parasitismus kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Mit fehlender oder nur gering vorhandener Befähigung zur Photosynthese wie z.B. in *Orobanche* oder *Cuscuta* geht eine holoparasitische Lebensweise einher, d.h. der Parasit ist für fast alle Abschnitte in seinem Lebenszyklus vollständig auf die Assimilate der Wirtspflanze angewiesen. Manche zur Photosynthese befähigte Gattungen, wie z.B. *Triphysaria*, sind hingegen fakultativ parasitär und können ihren Lebenszyklus ebenso ohne Wirt durchlaufen. Hemiparasiten, wie *Viscum* oder *Striga*, sind ebenso zu effektiver Photosynthese befähigt, hängen aber in Bezug auf die Versorgung mit Wasser und Mineralsalzen vom Wirt ab. Dennoch beziehen auch Hemiparasiten einen großen Teil der Assimilate von ihrem Wirt (Press et al. 1987; Ehleringer et al. 1985). Parasitäre Pflanzen sind fast auf der gesamten Welt beheimatet, werden allerdings auch immer wieder als Neophyten vom Menschen in neue Gebiete eingeschleppt. Vektoren für die Verbreitung sind dabei vor allem Saatgut aber auch Erde in Topfpflanzen.

Bedeutung für den Menschen haben parasitäre Pflanzen vor allem als Schädlinge in der Landwirtschaft, wo sie in manchen subtropischen und ariden Regionen für massive Ernteverluste verantwortlich sind. Eine Bekämpfung der Pflanzen ist dabei mit herkömmlichen Methoden wie Herbiziden nur eingeschränkt möglich, da die Lebensweise der parasitären Pflanzen stark an die der Wirtspflanzen gekoppelt ist und die Keimlinge von *Cuscuta*, *Orobanche* und *Striga* jeweils innerhalb von wenigen Tagen die Verbindung zur Wirtspflanze herstellen. So keimen die Samen der *Orobanchaceae* erst bei Anwesenheit einer Wirtspflanze und unter der

## I Einleitung

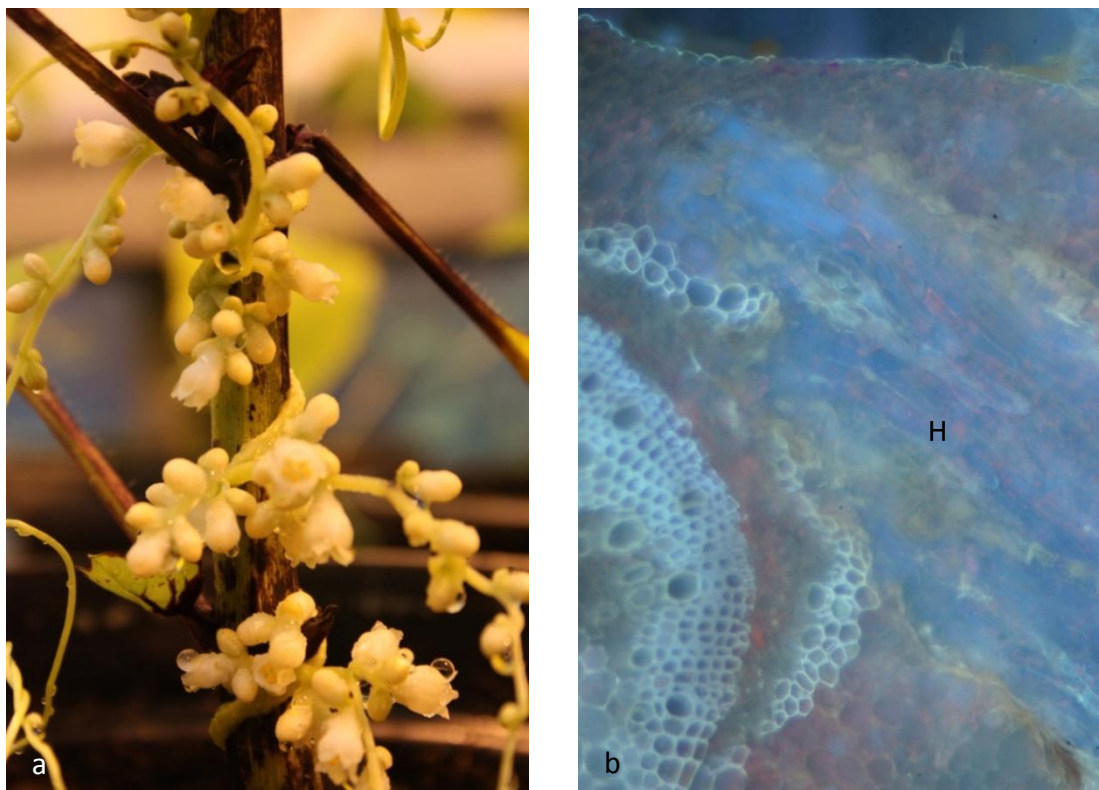
Bedingung eines einige Tage feuchten Bodens, also einer Voraussetzung, die auch für das Wachstum des Wirtes optimal ist. Orobanche keimt dabei temperaturabhängig, wobei diese einige Zeit erhöht sein muss, um ein effektives Keimen zu ermöglichen (Eizenberg et al. 2005). Die Verknüpfung von Parasit und Wirtspflanze über die Leitbündel führt beim Einsatz von Herbiziden automatisch zu einer Wirkung auf beide Organismen. Es hat Ansätze gegeben, dieser Tatsache mit herbizidresistenten Wirtspflanzen oder auf den Wirt angepassten Herbizidkonzentrationen zu begegnen (Joel et al. 1995; Aly et al. 2001; Goldwasser et al. 2003). Jedoch beruhen solche Verfahren auf der Verfügbarkeit von herbizidtoleranten oder resistenten Pflanzen oder präziser Dosierung der Herbizide. Da für *Striga* schon horizontaler Gentransfer vom Wirt zum Parasiten nachgewiesen werden konnte (Yoshida et al. 2010), und z.B. in *Cuscuta* die Transkription einer reversen Transkriptase bei der Haustorienbildung hoch reguliert wird (Albert 2005), kann zudem schlecht abgeschätzt werden, ob Herbizidresistenzen auf Dauer auch auf die Parasiten übertragen werden könnten. Vektoren hierfür stellen zwischen Wirt und Parasit mobile Viren dar (Birschwilks et al. 2006; Vachev et al. 2010) und auch die Übertragung von RNA von Wirt zu Parasit konnte bereits nachgewiesen werden (Roney 2007; Tomilov et al. 2008). Biotechnologische Ansätze zur Bekämpfung haben sich den Transportweg über das Haustorium zu Nutze gemacht, indem in transgenen Wirtspflanzen für den Parasiten schädliche Substanzen produziert und über die miteinander verbundenen Leitbündel in den Parasiten übertragen wurden (Hamamouch et al. 2005; Aly et al. 2009). Klassische Züchtungen von Pflanzen mit geringerer Anfälligkeit gegenüber parasitären Pflanzen wurden dagegen in der Vergangenheit immer wieder nach wenigen Jahren durch daran angepasste Varianten in unverändertem Ausmaß befallen.

### 1.1 *Cuscuta*

Die Gattung *Cuscuta*, im Deutschen Seide, gehört zur Familie der Windengewächse (Convolvulaceae) und lebt holoparasitisch. In ihrem Lebenszyklus bildet *Cuscuta* direkt nach der Keimung eine bald darauf degenerierende Keimwurzel und einen schnell elongierenden Spross aus. Der Spross sucht mit pendelnden Bewegungen Wirtspflanzen. Bei der Detektion spielen volatile Substanzen eine Rolle, die von der Wirtspflanze verströmt werden (Pennisi 2006). Wird ein Wirt gefunden, umwindet *Cuscuta* diesen und beginnt mit der Ausbildung von Haustorien (Abb. 1). Der Erkennungsprozess funktioniert dabei über Kontaktreize. So differenzieren *Cuscuta*sprosse auch Vorläuferorgane der Haustorien (Prehaustorien) aus, wenn es sich bei den umwundenen Objekten nicht um Pflanzen, sondern um leblose Objekte

## I Einleitung

(z.B. Stromkabel) handelt. Der Vorgang der Infektion muss innerhalb von wenigen Tagen abgeschlossen werden, da *Cuscuta* nur sehr begrenzte Befähigung zur Photosynthese besitzt (van der Kooij et al. 2000) und daher während dieser Phase auf die Reservestoffe im Samen angewiesen ist. Sobald eines oder mehrere Haustorien etabliert sind, setzt ein starkes Wachstum ein und *Cuscuta* kann dann mit Seitentrieben auch auf benachbarte Pflanzen übergreifen. Dieser Prozess kann unter klimatisch günstigen Voraussetzungen praktisch unbegrenzt fortgesetzt werden, solange kompatible Wirtspflanzen erreichbar sind. Kurztagbedingungen induzieren das Blühen von *Cuscuta* (Baldev 1962). Nach der Bildung von Samen stirbt der Spross von *Cuscuta* üblicherweise ab. In manchen Fällen betrifft dies aber nicht die Haustorien. Diese überdauern im Spross der Wirtspflanze und können unter günstigen Bedingungen wieder neue Sprosse hervorbringen, was die ohnehin schon aufwendige Bekämpfung durch Jäten weiter erschwert. *Cuscuta* befällt und schädigt ein breites Spektrum von kompatiblen Wirtspflanzen.



**Abbildung 1**

a) Von einer blühenden *Cuscuta reflexa* befallene Buntnessel (*Solenostemon scutellarioides*). b) In *S. scutellarioides* eingewachsenes Haustorium (H) von *C. reflexa* (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme).

### 1.2 Orobanchaceae

In der Familie der Orobanchaceae, bzw. der Sommerwurzgewächse, sind vor allem die Gattungen *Striga* und *Orobanche* / *Phelipanche* (Abb. 3) als landwirtschaftliche Schädlinge bekannt. Die Gattung *Orobanche* wurde mittlerweile in die zwei Gattungen *Orobanche* und *Phelipanche* aufgespalten. Es werden in dieser Arbeit daher bei Benennung der Arten die aktuellen Gattungsnamen verwendet. Bei der Beschreibung der für *Orobanche* und *Phelipanche* gemeinsamen Eigenschaften soll im Folgenden dagegen der Einfachheit halber von *Orobanche* die Rede sein.

In der Familie sind ausschließlich Wurzelparasiten zu finden, wobei sich *Striga* und *Orobanche* vor allem dadurch unterscheiden, dass *Striga* Photosynthese betreibt, während *Orobanche* diese Eigenschaft verloren hat. Zudem hat sich *Orobanche* auf Dikotyledonen spezialisiert, während die meisten Arten von *Striga* Monokotyledonen befallen. Abgesehen von diesen Einschränkungen haben beide Gattungen ein großes Wirtsspektrum mit hervorzuhebenden Ausnahmen wie z.B. *Orobanche cumana*, die ausschließlich auf Sonnenblumen parasitiert. Die Gattung *Triphysaria* beherbergt fakultativ parasitäre Pflanzen, was einen Vergleich von parasitären und nicht parasitären Stadien des gleichen Organismus ermöglicht. Von der folgenden Beschreibung der Lebenszyklen der Orobanchaceae ist *Triphysaria* daher ausgenommen.

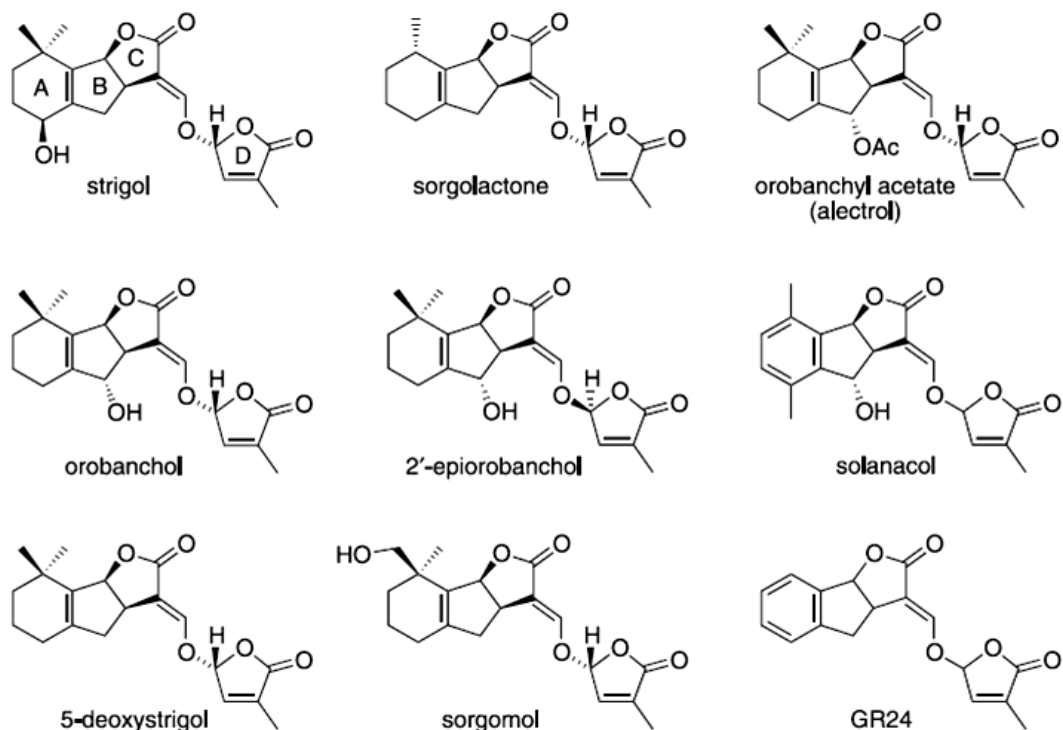
Die Keimung der ca. 0,3 mm großen Samen wird durch die Nähe einer Wirtspflanze ausgelöst. Deren Wurzeln sondern eine Gruppe von Keimungsstimulanzien ab, die seit der Aufklärung ihrer Rolle bei der Infektion durch *Striga* als Strigolactone (Abb. 2) bezeichnet werden. Die Wirtspflanze schüttet diese vor allem unter Phosphat- und Stickstoffmangel aus (Yoneyama et al. 2007), um die Bildung von Mykorrhiza durch symbiontische Pilze zu stimulieren. Entsprechend kann der Befall durch *Orobanche* und *Striga* auf landwirtschaftlich genutzten Flächen zumindest gebremst werden, indem man diesen Mangel mittels Mineraldüngern kompensiert. Dies setzt allerdings Intensivlandwirtschaft sowie entsprechende fachliche Kenntnisse über den Parasiten voraus und ist in vielen Ländern der Erde nicht gegeben. Eine weitere, auf den Strigolactonen aufbauende, Methode zur Bekämpfung wird *suicidal germination* genannt. Pflanzenarten, die nicht vom zu bekämpfenden Parasiten befallen werden können, aber dessen Keimung durch ihre Strigolactonausschüttung stimulieren können, werden auf den mit Samen des Parasiten verseuchten Äckern gepflanzt. Ein gewisser Teil der parasitären Pflanzensamen keimt somit und die Konzentration der Samen auf dem Feld kann auf diesem Wege verringert werden. Eine Pflanze mit solchen Eigenschaften wird daher *trap crop* genannt. Eine andere Variante dieser Methode setzt infizierbare Pflanzen ein, welche die parasitären Pflanzensamen sehr effektiv zu Keimung



## I Einleitung

bringen, sog. *catch crops*. Die Pflanzen werden abgeerntet, noch bevor der Parasit Samen bilden kann, was wiederum eine zuverlässige Kontrolle des Feldes voraussetzt.

Alternativ wird an der Synthese von zu Strigolactonen analogen Substanzen geforscht (Malik et al. 2010; Daws et al. 2008; Kondo et al. 2007), die ebenfalls in der Lage sind, die Keimung von Orobanchaceae zu stimulieren. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Substanzen auch im Boden ihre Aktivität behalten (Kgosi et al. 2012). Zusätzlich sind für Orobanchaceae pathogene Organismen bekannt (Linke et al. 1990) und es gibt Bemühungen, diese für Bekämpfungsmaßnahmen zu verwenden (Kohlschmid et al. 2009).



**Abbildung 2**

Strukturformeln einiger bekannter Strigolactone sowie des synthetischen Analogons GR24 (Yoneyama et al. 2008).

Sobald die Parasiten gekeimt sind, muss ihre Keimwurzel innerhalb weniger Tage eine Wirtswurzel erreichen. Ist die Wurzel in unmittelbarer Nähe lokalisiert, wird sie über eine erhöhte Konzentration von phenolischen Abbauprodukten der Zellwände der Wirtspflanze erkannt. Diese können vom Parasiten durch Ausschüttung von Wasserstoffperoxid und der Expression von Peroxidasen und Oxidoreduktasen in ihrem Redoxpotential verändert und somit zum Haustorium induzierenden Faktor (HIF) werden (Smith et al. 1996; Kim et al. 1998; Matvienko et al. 2001). Die

## I Einleitung

Anwesenheit solcher Faktoren löst dann eine Umdifferenzierung der Keimwurzel zum Haustorium aus. Ist ein Haustorium etabliert, setzt ein starkes Wachstum des nun an die Nährstoffe des Wirtes angebundenen Parasiten ein. Auf der Basis eines mehr oder weniger stark ausgebildeten Tuberkels bildet sich ein Spross, der innerhalb weniger Wochen die Erdoberfläche durchstößt. Noch vor diesem ersten von außen sichtbaren Stadium kommt es bei starkem Befall schon zu einer irreversiblen Schädigung der Wirtspflanze durch die unterirdischen Stadien. Wird gegen die oberirdischen Stadien der Parasiten nichts unternommen, kommt es zur Ausbildung von Blüten und schließlich von Samenkapseln. Pro Spross von Orobanche können auf diese Weise Samen entstehen, deren Anzahl in die Hunderttausende geht und die mit bis zu 15 Jahren (Wegmann 1999) eine für ihre staubkornartige Größe sehr lange Überlebensfähigkeit besitzen.



**Abbildung 3**

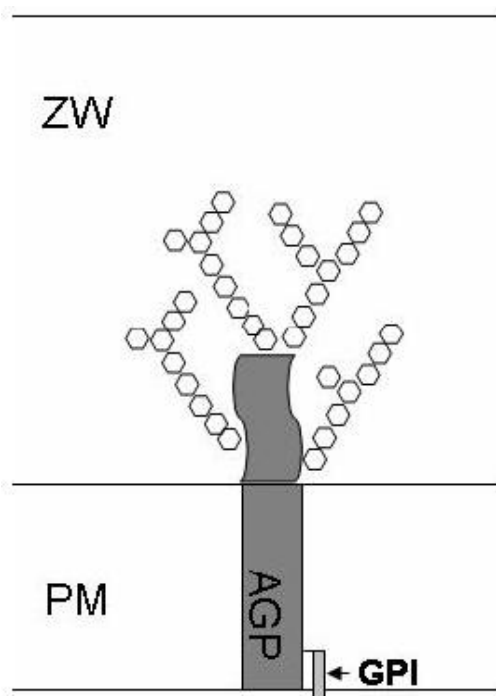
Von *Phelipanche aegyptiaca* (rechts) befallene Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*)

### 1.3 Vorarbeiten

Die Ergebnisse und Vorarbeiten, auf denen diese Arbeit aufbaut, sollen im Folgenden geschildert werden.

#### 1.3.1 attAGP

Das *attachment Arabinogalactanprotein* (attAGP) aus *Solanum lycopersicum* gehört zu den klassischen Arabinogalactanproteinen (AGP) (Albert et al. 2006). AGPs sind membranständig und zeichnen sich durch intensive Glykosylierung mit den namensgebenden Zuckern Arabinose und Galaktose aus (Showalter 2001). Diese sind auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 4). Es gibt Hinweise, dass AGPs in die Zellwandsynthese involviert sind (Zhang et al. 2003). Zudem ist mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker die Möglichkeit einer Signaltransduktion über das attAGP gegeben. Über AGPs könnten z.B. Apoptosesignale übertragen werden (Gao & Showalter 1999).

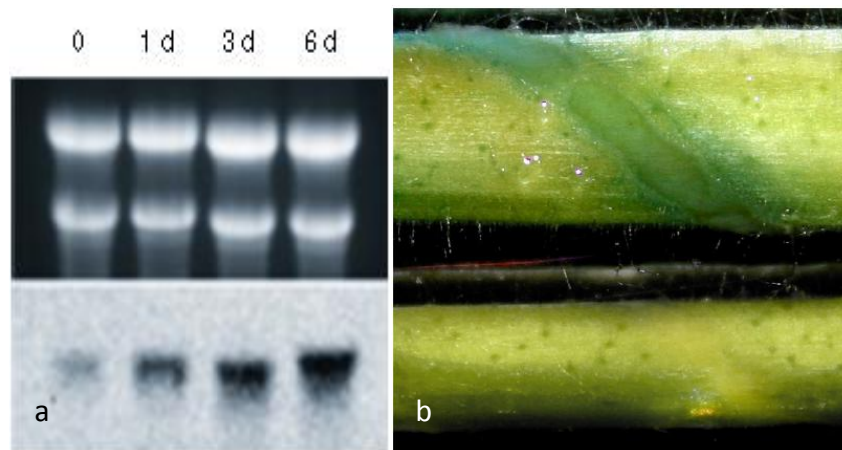


**Abbildung 4**

Schematische Abbildung eines Arabinogalactanproteins. GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker; PM: Plasmamembran; ZW: Zellwand (Albert 2005)

## I Einleitung

Mittels eines Konstrukts, in dem der attAGP-Promotor die Expression des Gens für  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) steuert, konnte in Tomaten gezeigt werden, dass diese attAGP exprimieren sobald sie von *Cuscuta* befallen werden (Albert et al. 2006). Dabei findet die Expression genau in den Bereichen statt, in denen die Haustorien von *Cuscuta* in das Wirtsgewebe eindringen (Abb. 5). Namensgebende Eigenschaft (attachment) für das attAGP ist seine Fähigkeit, die Anheftungskraft von *Cuscuta* zu verstärken.



**Abbildung 5**

Expression von attAGP in *S. lycopersicum* (Albert et al. 2006)

a) Northern Blot, mit Sonde gegen attAGP hybridisiert; 0-6d: Tage nach Infektion

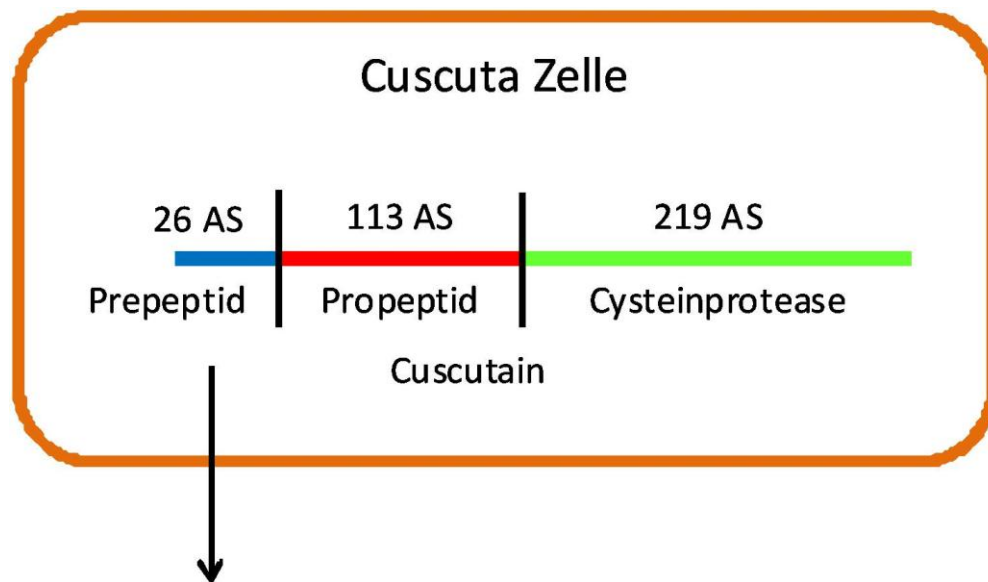
b) Oben: *S. lycopersicum*, die ein Konstrukt aus attAGP-Promotor und uidA (GUS) exprimiert. Unten: Wildtypstamm; Die Pflanzen wurden drei Tage nach dem Beginn der Infektion durch *C. reflexa* mit X-Gluc gefärbt.

### 1.3.2 Cuscutain

Die exo-Cysteinprotease Cuscutain wurde von Marc Bleischwitz charakterisiert. Gegenüber Sprossgewebe von *C. reflexa* ohne Haustorien ist die Menge an gebildetem Transkript für Cuscutain in Haustorien deutlich erhöht (Albert 2005; Bleischwitz et al. 2010). Cuscutain entfaltet seine Wirkung außerhalb der Cuscutazellen. Die Peptidsequenz des als inaktives Proenzym exprimierten Cuscutain enthält dafür am N-Terminus eine Signalsequenz, die mit der Sezernierung der unreifen Cysteinprotease abgespalten wird. Zusätzlich ist zwischen Signalpeptid und Cysteinprotease ein sogenanntes Propeptid vorhanden. Das Propeptid inhibiert das Cuscutain durch Maskierung von dessen aktivem Zentrum. Nach Sezernierung des Proenzyms wird das Propeptid abgespalten und das Enzym wird aktiv (Abb.6). Es konnte nachgewiesen werden, dass das Propeptid, in

## I Einleitung

ausreichenden Konzentrationen vorhanden, das aktive Cuscutain inhibieren kann (Bleischwitz et al. 2010). In dem Zusammenhang konnten auch die Infektionsraten von *C. reflexa* durch externe Applikation des Propeptides auf Tabakpflanzen gesenkt werden.



**Abbildung 6**

Schematische Darstellung von Cuscutain (nach Bleischwitz, 2008) mit Längenangaben der Peptideinzelsequenzen in Aminosäuren (AS). Das Prepeptid dient als Signalsequenz für die Sezernierung der unreifen Cysteinprotease. Mit Sezernierung des Enzyms werden Pre- und Propeptid abgespalten und die Cysteinprotease wird an ihrem Bestimmungsort aktiv.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Oberstes Ziel war das Finden und Aufklären von Mechanismen, die für die Infektion sowohl in den parasitären Pflanzen als auch auf Seite der Wirtspflanze eine Rolle spielen. Für die verfolgten biotechnologischen Ansätze zur Bekämpfung der Parasiten ist die Kenntnis dahinter liegender Gene und ihrer Steuerung von großem Interesse. Mit dem Wissen darüber ließen sich in Wirtspflanzen vorhandene Resistenzen verstärken oder auf andere Pflanzen übertragen. Ebenso kann man aber auch neue Bekämpfungsmethoden entwickeln, indem die für den Infektionsprozess notwendigen Gene von Wirt und Parasit identifiziert werden und ihre Expression gezielt ausgeschaltet wird. Dies kann über von außen applizierte oder innerhalb der Pflanze produzierte Hemmstoffe geschehen. Ein vielversprechender Ansatzpunkt ist dabei der Beginn der Infektion und das damit verbundene Einwachsen des Haustoriums in die Wirtspflanze. Die parasitäre Pflanze

## I Einleitung

ist in diesem Stadium sehr verletzlich und auf die zeitnahe Infektion nach der Keimung angewiesen. Selbst wenn es nicht zum kompletten Verhindern der Ausbildung von Haustorien kommt, kann eine Verlangsamung so zu einer drastischen Senkung der Infektionsraten führen

Orobanchaceae und *Cuscuta* zeigen hier nicht nur morphologische sondern auch molekularbiologische Ähnlichkeiten während der Infektion. Da beide Parasiten mit der Ausbildung ihrer Haustorien mechanische Barrieren im Wirtsgewebe überwinden müssen, exprimieren sie Enzyme, die am Abbau der Zellwand beteiligt sind (Nagar et al. 1984; Losner-Goshen et al. 1998). Pflanzen haben Abwehrmechanismen gegen solcherlei, auch von Pilzen beim Einwachsen in pflanzliches Gewebe verwendete Angriffe entwickelt. Einer davon ist die Expression von Polygalacturonase inhibierender Proteine in der Zellwand (Ferrari et al. 2006).

Daher lag ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Frage, ob die in den Vorarbeiten beschriebenen und für *Cuscuta* bekannten Mechanismen auch in *Phelipanche* vorhanden sind und sich damit evtl. für ähnliche Bekämpfungsstrategien ausnutzen lassen.

In dieser Arbeit wurde das PrePropeptid aus dem Cuscutain unter diesem Aspekt, seiner Wirksamkeit gegen Infektionen durch *P. aegyptiaca*, untersucht. Weiterhin ist es für die biotechnologische Herstellung resistenter Pflanzen sinnvoll, möglichst spezifische Promotoren zu finden, die mit dem Befall der Wirtspflanze durch den Parasiten induziert werden können. Das Transgen wird auf diese Weise ohne eine akute Infektion durch die parasitäre Pflanze nicht dauerhaft oder nur schwach exprimiert, wodurch die gesparten Ressourcen von der Wirtspflanze anderweitig investiert werden können. Zum anderen sind auf diese Weise sogar Abwehrmechanismen vorstellbar, die für die Wirtspflanze selbst schädlich sind. Offensichtliche Ansatzpunkte stellen nachweisbare Genexpressionen der Wirtspflanze nach Infektion durch die parasitäre Pflanze dar. Da mit dem attAGP-Promotor eine Sequenz vorlag, welche diese Voraussetzungen auch in Bezug auf die lokale Induzierbarkeit durch *Cuscuta* besitzt, wurde auf diesen zurückgegriffen. Damit einhergehend sollte eine nähergehende Charakterisierung der Induzierbarkeit des attAGP-Promotors erfolgen. Markus Albert (2005) schlägt dabei eine Regulation über die Phytohormone Auxin, Salicylsäure, Gibberellin oder Abscisinsäure vor.

Weiterhin sollten Ähnlichkeiten oder auch Unterschiede sowohl hinsichtlich der Struktur als auch der Expression von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca* ausgemacht werden, um Hinweise auf eine Rolle dieser Enzyme bei der Infektion durch *Phelipanche* zu erhalten. Hierzu standen öffentlich verfügbare Daten aus Roche454- und Illumina-Sequenzierungen zur Verfügung.

## I Einleitung

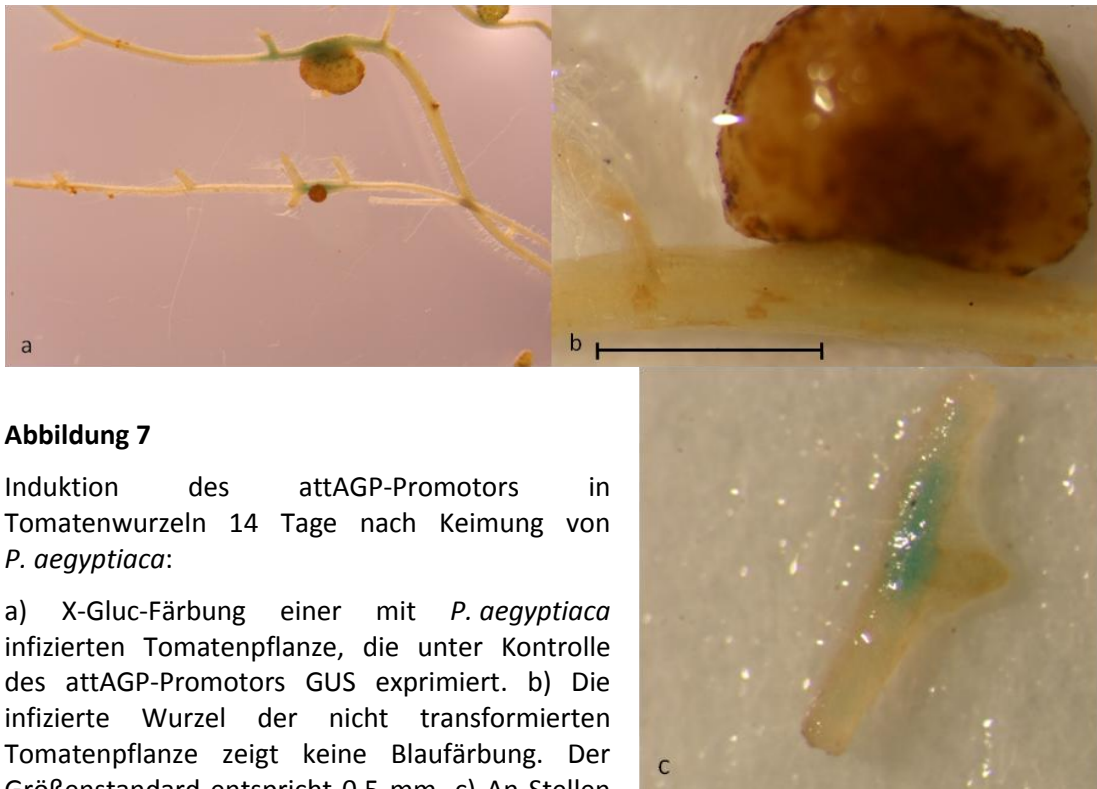
Nach Herstellung entsprechender Promotor-Inhibitorstrukturen sollten diese in Pflanzen transformiert werden. Ziel war es, die Pflanzen dann hinsichtlich ihrer Anfälligkeit für die Infektion mit den pflanzlichen Parasiten *C. reflexa* und *P. aegyptiaca* zu untersuchen.

Die Konstrukte bestanden dabei aus der Sequenz des Prepeptid in seiner natürlichen Fusion mit dem Propeptid, deren Expression jeweils entweder unter Kontrolle eines verdoppelten 35S-Promotors aus dem Blumenkohl-Mosaik Virus stand oder vom attAGP-Promotor gesteuert wurde. Das Konstrukt aus 35S-Promotor und PrePropeptid wurde dabei von Marc Bleischwitz hergestellt und im Zuge dieser Arbeit in Tabakpflanzen transformiert.

## II. Ergebnisse

### 1.1 Induktion des attAGP-Promotors durch Phelipanche in Tomatenpflanzen

*S. lycopersicum* cv. moneymaker Pflanzen, die ein Konstrukt mit einem vom attAGP-Promotor gesteuerten  $\beta$ -Glucuronidase-Gen enthielten, waren bereits vorhanden. Werden diese Pflanzen mit *Cuscuta* infiziert, zeigt sich nach Entfernung des Parasiten und Inkubation der Tomatenpflanze mit X-Gluc-Färbelösung eine Blaufärbung an der Infektionsstelle (Albert et al. 2006). Die Tomatenpflanzen wurden im *in vitro polybag*-System kultiviert und *P. aegyptiaca*-Samen wurden über ihren Wurzeln verteilt. Nach erfolgter Infektion durch *P. aegyptiaca* wurden die Pflanzen dem Plastikbeutel entnommen. Dies geschah 14 Tage nach Induktion der Keimung der Phelipanchesamen. Die Wurzeln wurden mit X-Gluc-Färbelösung behandelt. Um die Möglichkeit unspezifischer Färbungen auszuschließen, wurden parallel nicht transformierte Tomatenpflanzen mit Phelipanchetuberkeln in der Färbelösung inkubiert, welche unter gleichen Bedingungen aufgezogen worden waren.



**Abbildung 7**

Induktion des attAGP-Promotors in Tomatenwurzeln 14 Tage nach Keimung von *P. aegyptiaca*:

a) X-Gluc-Färbung einer mit *P. aegyptiaca* infizierten Tomatenpflanze, die unter Kontrolle des attAGP-Promotors GUS exprimiert. b) Die infizierte Wurzel der nicht transformierten Tomatenpflanze zeigt keine Blaufärbung. Der Größenstandard entspricht 0,5 mm. c) An Stellen an denen sich Seitenwurzeln bildeten, konnte in seltenen Fällen ebenfalls eine Blaufärbung beobachtet werden.



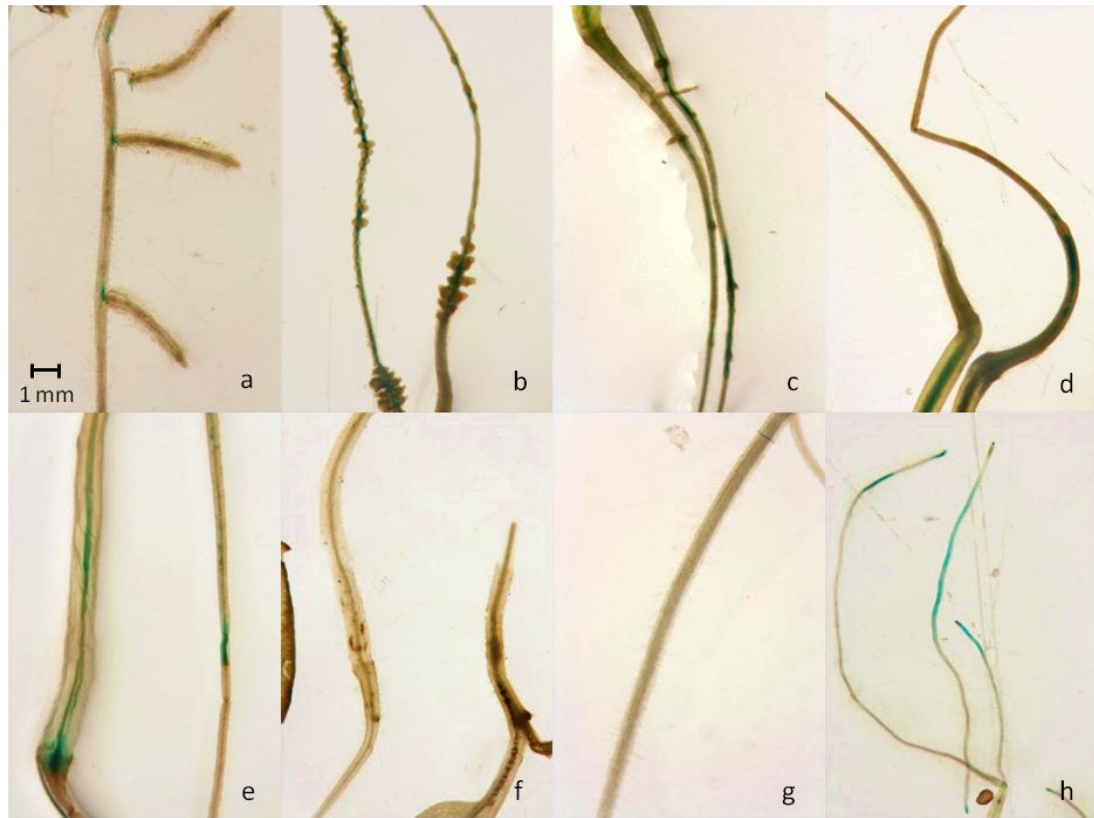
## II Ergebnisse

Die Wurzeln der transgenen Pflanzen zeigten an den Infektionsstellen von *Phelipanche* eine Blaufärbung (Abb. 7a). Die Kontrollpflanzen zeigten keine Färbung (Abb. 7b). Die Intensität der Färbung verlief zwischen einem kräftigen Blau und einer matteren Färbung. Wurzeln, die mit kleineren *Phelipanchetuberkeln* infiziert waren, zeigten sich intensiver gefärbt. Demgegenüber war an mit *Phelipanche* infizierten Wurzeln in späteren Entwicklungsstadien, wie etwa dem frühen ‚Spinnenstadium‘, keine Blaufärbung mehr wahrnehmbar. Der Großteil der mit X-Gluc gefärbten Bereiche der Tomatenwurzeln ließ sich auf *Phelipanchetuberkel* zurückführen, die direkt am Ort der intensivsten Färbung der Wurzel parasitierten. Es fanden sich weiterhin in seltenen Fällen Färbungen in Bereichen der Wurzel, an denen sich neue Seitenwurzeln bildeten (Abb. 7c). Um eine unspezifische Färbung durch Umsetzung des X-Gluc-Substrates durch *P. aegyptiaca* selbst auszuschließen, wurden Tuberkel aufgeschnitten und auf eine Färbung hin untersucht. Die Tuberkel zeigten keine Färbung, wobei keine Rolle spielte, ob diese auf untransformierten Tomatenpflanzen oder jenen mit dem vom attAGP-Promotor gesteuerten GUS-Gen gewachsen waren.

### 1.2 Induktion des attAGP-Promotors durch Phytohormone und zellwandabbauende Enzyme

Um die mögliche Rolle von Phytohormonen und zellwandabbauenden Enzymen bei der Aktivierung des attAGP-Promotors zu analysieren, wurden Keimlinge von *S. lycopersicum* auf MS-Medium transferiert, das entweder die beiden Auxinanaloga NAA oder 2,4-D, Abscisinsäure, Salicylsäure oder Mazerozym enthielt. Als Kontrolle diente reines MS-Medium ohne Phytohormone. MS-Medium, das mit 90 mM Saccharose versetzt worden war, sollte zum einen die Bildung von Seitenwurzeln induzieren. Desweiteren enthält der attAGP-Promotor ein W-Box Element (TGACT), welches durch Saccharose induziert werden kann (Sun et al. 2003). Da sich mittels Hefeextrakt in Pflanzen zur Pathogenabwehr bestimmte Antworten provozieren lassen, wurde auch mit Hefeextrakt versetztes MS-Medium verwendet. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge vom jeweiligen Medium entfernt und mittels einer X-Gluc-Färbung über Nacht gefärbt.

## II Ergebnisse



**Abbildung 8**

X-Gluc-Färbungen der attAGP-GUS-Tomatenpflanzen unter Einfluss verschiedener Phytohormone:

a) MS-Medium + 0,5  $\mu$ M NAA; b) MS-Medium + 5  $\mu$ M NAA; c) MS-Medium + 10  $\mu$ M NAA; d) MS-Medium + 10  $\mu$ M 2,4-D; e) MS-Medium + 5  $\mu$ M Salicylsäure; f) MS-Medium + 2,5 mg / ml Mazerozym; g) MS-Medium; h) 35S-GUS-Tabak

Es zeigte sich, dass eine Blaufärbung stattfand, wenn die Keimlinge auf Medium mit Auxin-Analoga wie NAA und 2,4-D kultiviert worden waren (Abb. 8a-d). Im Falle von NAA zeigte sich bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M punktuell eine Färbung im Abzweigungspunkt von Seitenwurzeln. Bei 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M NAA war einerseits die Häufigkeit der Ansatzpunkte für Seitenwurzeln drastisch erhöht. Desweiteren fanden sich dort als auch an größeren Bereichen vom Spross Blaufärbungen. 10  $\mu$ M 2,4-D hatten ebenfalls einen Effekt hinsichtlich erhöhter Bildung von Seitenwurzeln. Auch Salicylsäure rief bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M eine Färbung hervor (Abb. 8e). Niedrigere Konzentrationen von 0,1, 0,2, 0,3 und 1  $\mu$ M hatten keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Eine Blaufärbung konnte sowohl an den Wurzeln als auch am Spross beobachtet werden. 2,5 mg / ml Mazerozym verursachten dagegen keine Färbung, jedoch teilweise nekrotische Bereiche an den Tomatenwurzeln, die vermutlich auf die Wirkung des Enzyms zurückzuführen sind (Abb. 8f). Abscisinsäure in Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M rief keine Expression hervor,

## II Ergebnisse

ebenso wenig wie 4 g/l Hefeextrakt. Mit 90 mM Saccharose versetztes MS-Medium hatte zwar einen positiven Effekt auf die erhöhte Bildung von Seitenwurzeln, jedoch konnte auch hier keine Färbung festgestellt werden. Pflanzen, die zur Kontrolle auf reinem MS-Medium gewachsen waren, zeigten ebenso keine Blaufärbungen (Abb. 8g). Als Kontrolle für die X-Gluc-Färbung wurden Tabakpflanzen verwendet, welche das GUS-Gen unter Kontrolle eines 35S-Promotors exprimieren (Abb. 8h). Die Versuche wurden dreimal mit jeweils zwei Keimlingen durchgeführt.

### 1.3 Analyse von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca*

Ziel war die Ermittlung einer eventuellen Konvergenz der parasitären Pflanzen *P. aegyptiaca* und *C. reflexa* hinsichtlich der Expression von Cysteinproteasen. Zunächst wurden dafür Cysteinproteasesequenzen aus *P. aegyptiaca* mit Ähnlichkeit zu der in *C. reflexa* gesucht. Desweiteren wurde ihre Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bestimmt. Für die Sequenz- und Expressionsanalyse wurde auf Sequenzdaten des Parasitic Plant Genome Project (PPGP) zurückgegriffen (Westwood et al. 2012). Dieses stellt für verschiedene Gewebetypen und Entwicklungsstadien u.a. von *P. aegyptiaca* cDNA-Sequenzdaten bereit, die mittels Roche454- und Illumina-Sequenzierer gewonnen wurden. Die Daten können unter bestimmten Bedingungen frei verwendet werden. Diese Bedingungen können in dem Dokument „Sharing Data from Large-scale Biological Research Projects: A System of Tripartite Responsibility“ (<http://www.sanger.ac.uk/datasharing/assets/fortlauderdalereport.pdf>) eingesehen werden.

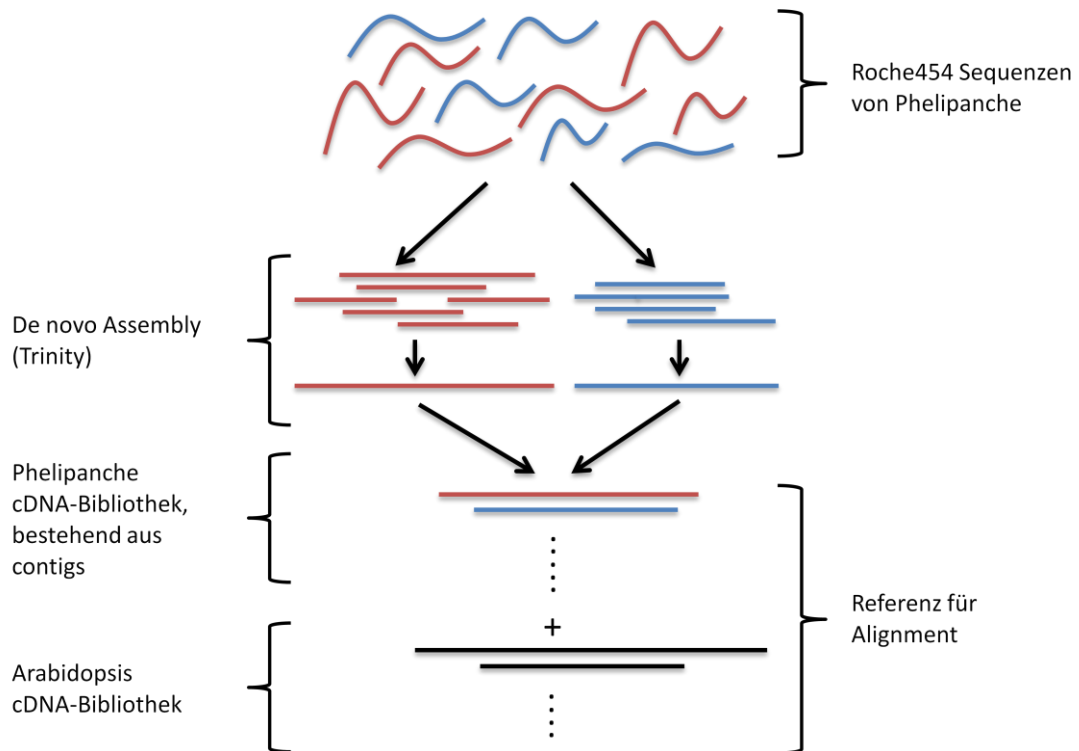
#### 1.3.1 Erstellung eines Transkriptoms von *P. aegyptiaca*

Die im PPGP vorhandenen mit Roche454- und Illumina-Sequenzierern gewonnenen cDNA-Sequenzen werden als *reads* bezeichnet. Diese standen für mit der Roche454-Methode gewonnene Daten mit einigen hunderttausend Einzelsequenzen pro Entwicklungsstadium zu Verfügung. Die durchschnittliche Länge der Sequenzen lag dabei üblicherweise bei 200 bis 350 Nukleotiden. Solch lange Sequenzen eignen sich gut für die Herstellung eines Transkriptoms. Es existieren verschiedene Algorithmen und darauf aufbauende Programme, mit denen solche Sequenzen miteinander verglichen werden können. Bei Überlappung wird dann aus mehreren Einzelsequenzen ein sogenanntes *contig* gebildet, welches im besten Falle das komplette Transkript umfasst. In der Familie der Orobanchaceae existierte zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit kein komplett sequenziertes Genom. Daher

## II Ergebnisse

wurden die im PPGP vorhandenen Roche454-Sequenzdaten benutzt, um daraus mit dem Programm Trinity (Grabherr et al. 2011) *de novo* ein Transkriptom zusammenzusetzen (Abb. 9). Mit diesem Transkriptom wurden sowohl die darin enthaltenen Sequenzen analysiert als auch später die Illumina-reads abgeglichen, um den Transkriptlevel in einzelnen Geweben zu bestimmen. Im PPGP sind solche *Assemblies* genannten und auf die oben beschriebene Weise hergestellten Transkriptome bereits vorhanden. Jedoch fanden sich darin Kontaminationen durch die jeweiligen Wirtspflanzen *Arabidopsis thaliana* und *N. tabacum* (Jim Westwood, persönliche Kommunikation). Im Prinzip lassen sich zwar solche Sequenzen erkennen und herausfiltern, jedoch besteht zumindest die theoretische Gefahr, dass bei der Erstellung des Transkriptoms auch chimäre Sequenzen aus Wirt und Parasit entstehen. Zudem ergaben mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997) durchgeführte Abgleiche mit verschiedenen konservierten Sequenzen, dass das Assembly auch eine große Anzahl von kleineren Fragmenten enthält, welche wahrscheinlich nicht zu einer mRNA zusammengesetzt wurden.

## II Ergebnisse



**Abbildung 9**

Vereinfachtes Schema der Assemblierung des Transkriptoms: Mittels des *de novo* Assemblers Trinity wurden mittels Roche454-Technik sequenzierte Bruchstücke von mRNAs aus Gewebe von *P. aegyptiaca* einander zugeordnet und ergaben sogenannte contigs, in denen idealerweise das gesamte Transkript oder große Teile davon rekonstruiert sind. Je häufiger ein Transkript oder seine verschiedenen Isoformen im Ausgangsgewebe vorliegen, desto größer ist üblicherweise der Anteil, der in einem contig oder dessen verschiedenen Isoformen repräsentiert ist. Zu dem Phelipanchetranskriptom wurde anschließend noch eine cDNA-Bank von *A. thaliana* hinzugefügt. Beide bilden zusammen die Referenz für die Zuordnung der Illumina-Daten (Abb. 12) und damit die Basis der Expressionsanalyse.

Für das *de novo Assembly* wurden die Datensätze OrAe1F und OrAe2F des PPGP verwendet. Ersterer wurde aus Keimlingen von *P. aegyptiaca* gewonnen und letzterer aus Keimlingen, bei denen die Haustorienbildung induziert wurde, indem diese für 6, 12 und 24 Stunden auf Wurzeln von *A. thaliana* gelegt wurden. Die Keimlinge wurden dann mit Wasser von der Wurzel gespült und für die Sequenzierung präpariert (Jim Westwood, persönliche Kommunikation). Es konnte daher auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen Zellmaterial von Arabidopsis in die Probe gelangt waren. Nach dem Assembly-Prozess wurden darum Maßnahmen getroffen um das Ausmaß dieser Kontamination zu bestimmen und seinen späteren Einfluss auf die Expressionsanalyse gering zu halten.

Die Erstellung des Transkriptoms wurde mit dem Programm Trinity durchgeführt und brachte 38.408 contigs. Diese wurden später für das *Alignment*, also die

## II Ergebnisse

Zuordnung der Illumina-Sequenzen (Abb. 12), als Referenz verwendet. Die Durchschnittslänge der contigs betrug 659,2 bp  $\pm$  407,2 Standardabweichung.

Das gesamte assemblierte Transkriptom wurde einer blastn-Suche (Altschul et al. 1997) gegenüber der von NCBI bezogenen nicht redundanten Nukleotid-Datenbank (nt) unterzogen. Dieser, gegenüber einem peptidbasierten blastx (Altschul et al. 1997) deutlich schnellere BLAST, ermöglichte eine erste grobe Einordnung der Sequenzen zu schon bekannten Genen und eignete sich somit vor allem, um große Ähnlichkeiten zu *A. thaliana* auf Nucleotidsequenzebene ausfindig zu machen. Die Alignments der BLAST-Ergebnisse wurden bei Zuordnung zu einer Arabidopsis-Sequenz ab einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $e^{-60}$  einer genaueren Betrachtung unterzogen. Dabei konnten 18 contigs identifiziert werden, die auf Arabidopsis-Sequenzen beruhen. Diese wurden folglich für die Auswertung dem Bereich der Arabidopsis-cDNA angefügt und damit auch aus dem für die Expressionsanalyse von Phelipanche relevanten Teil des Alignments entfernt. Diesen contigs wurden beim Alignment der Illumina-Daten nur wenige reads zugeordnet, die sich dazu relativ gleichmäßig auf die verschiedenen ausgewerteten Datensätze verteilten. Es wurden auch unter diesen Sequenzen keine Ähnlichkeiten zu Cysteinproteasen ausgemacht.

### 1.3.2 Ähnlichkeit von Cysteinproteasen aus *P. aegyptiaca* und *C. reflexa*

Mit der Peptidsequenz von Cuscutain wurde eine Suche mittels tblastn (Altschul et al. 1997) gegen das assemblierte Transkriptom von *P. aegyptiaca* durchgeführt. Phelipanchesequenzen von BLAST-Ergebnissen, welche die geringste Fehlerwahrscheinlichkeit aufwiesen, wurden mittels blastx mit der nicht redundanten (nr) Proteindatenbank von NCBI abgeglichen. Wenn die Sequenz eines solchen contigs durchgängig hohe Übereinstimmung mit Exo-Cysteinproteasen aufwies, wurde sie in die Expressionsanalyse aufgenommen. Die 20 ähnlichsten contigs wurden somit ausgewählt. Die Durchschnittslänge betrug 1001,85 bp  $\pm$  410,6. Es wurde ein Nukleotidblast (blastn) mit den Cysteinprotease-Sequenzen gegen die nicht redundante (nr) Sequenzdatenbank von NCBI durchgeführt. Dieser zeigte in keinem Falle größere Übereinstimmungen der Sequenzen mit Arabidopsis, als mit anderen Pflanzen. Auch Alignments mit Arabidopsissequenzen zeigten zwar auf Peptidebene konservierte Bereiche, auf Nukleotidebene variierten diese jedoch stark, wie aufgrund der Degeneration des genetischen Codes zu erwarten war. Kontaminationen durch Transkripte von Arabidopsis können somit als sehr unwahrscheinlich gelten.

## II Ergebnisse

```
Cuscutain  MALRLSLMFLLCSEFLVTTSLGLADG---SSDDILIRQVVGD---DGALLSDDHQTIV 53
Orobanchel -MPPFSLLYLLP-LALLSSALASTDGFIDTLTEDPLIRQVVSVDGVEAVDHLHADHHFSL 58
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  FKKRFGKAYASEEEHDYRFSVFKANMRLAKQHQQLDPSAVHGVTRFSDLTPSEFKRNLG 113
Orobanchel FKAKYGKTYATQEEHDHRSVFKANLRRSKRHQLLDPSAVHGVTKFSDLTPDEFKSYLG 118
          ** :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  LN-RRLRFPADAQTAPTLPDLDPSDFDWRDHGAVTAVKNQSGSGSCWSFSTTGALEGAN 172
Orobanchel LHKRRLKLPVDAHKAPEVLPDNDLPDLDWRDHGAVTAVKDQSGSGSCWSFSTTGALEGAN 178
          * :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  FLATGKLVSLSEQQLVDCDHECDPEEAGSCDSCNGGLMTSAFEYTLKAGGLMREEDYPY 232
Orobanchel YLATGKLVSLSEQQLVDCDHECDPEHDS CDAGCDGGLMNNAFEYTLKVGGLQKEKDYPY 238
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  TGNDQVCNFDKTKIAAKVANFSVSLDEDDQIAANLVKNGLAVAINAVFMQTYAGGVSC 292
Orobanchel TGTDG-VCKFDKSKIAASVSNFSVSLDDDDQIAANLVNYGLAVGINAAMQTYIGGVSC 297
          **_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  PYICSKRLDHGVLLVGYSAGYAPVRAKEKPYWIKNSWGEQWGEKGYIKICRGSNVCGV 352
Orobanchel PYVCGKHLDHGVLLVGYGSGYAPIRLKDKPYWIIKNSWGESWGENGYIKICRGRNVCGV 357
          **_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Cuscutain  DSMVSTVA AVSTNSE 367
Orobanchel ESMVSTVNA AHVTSE 372
          :*****_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*
```

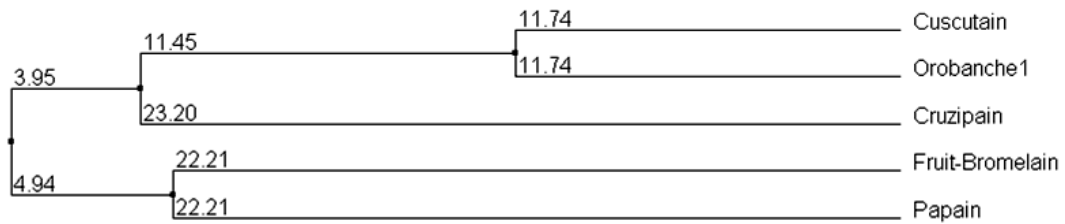
Abbildung 10

Alignment von Cuscutain und dem dazu ähnlichsten contig des Phelipanchetranskriptoms Orobanchel1. Orobanchel1 entspricht dabei dem contig ‚comp502\_c0\_seq1‘ aus dem Transkriptom. Der rote Balken zeigt den Bereich der Domäne für einen Cathepsin Propeptid Inhibitor, der grüne den Bereich für eine Peptidase C1. Die Domänen wurden mit NCBI blastp (Altschul et al. 1997) ermittelt. Potentielle Schnittstellen für das Prepeptid sind gelb unterlegt. Das Alignment wurde mit ClustalW (Goujon et al. 2010) durchgeführt, potentielle Schnittstellen mittels SignalP (Petersen et al. 2011) identifiziert und die Domänen mit dem Blastprogramm ermittelt.

Das Alignment zeigte auf Peptidebene deutliche Übereinstimmung zwischen dem contig aus dem Phelipanchetranskriptom und der Sequenz von Cuscutain (Abb. 10). Auffällig war die stärkere Übereinstimmung im Bereich der Domänen von Propeptid und Cysteinprotease.

Mittels ClustalW (Goujon et al. 2010) wurde ein Stammbaum der Cysteinproteasen von *C. reflexa*, *P. aegyptiaca* und weiterer Organismen erstellt (Abb. 11). Hierzu wurden die jeweiligen Peptidsequenzen von Cruzipain, Bromealin und Papain verwendet.

## II Ergebnisse



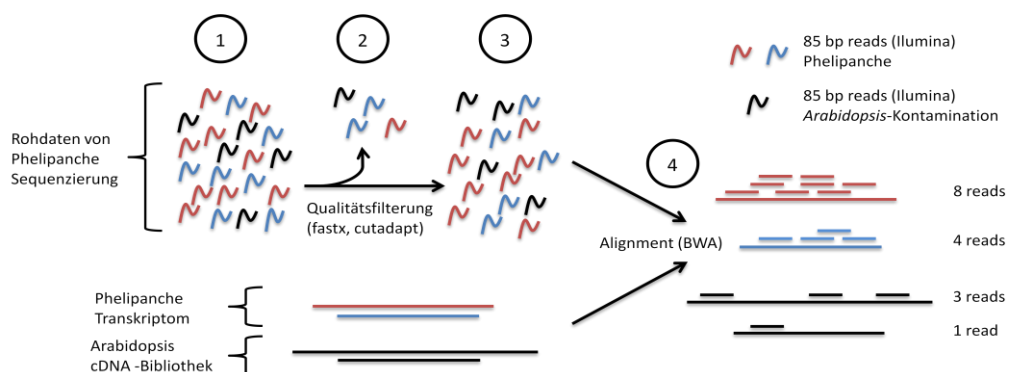
**Abbildung 11**

Phylogenetischer Stammbaum der Peptidsequenzen von Orobanche1, Cuscutain, Cruzipain aus *Trypanosoma cruzi*, Bromelain aus Frucht und Stamm von *Ananas comosus* sowie Papain aus *Carica papaya*. Der Stammbaum wurde mittels ClustalW unter Nutzung der Parameter ‚average distance using % identity‘ erstellt.

Es zeigt sich auch hier eine stärkere Ähnlichkeit zwischen dem Cuscutain und der Cysteinprotease aus Orobanche. Weiterhin bestehen mehr Ähnlichkeiten zu Cruzipain als zu Bromelain und Papain.

### 1.4 Expressionsanalyse von Transkripten aus *P. aegyptiaca*

Um auch Gewebe, die in Kontakt mit *A. thaliana* gekommen waren analysieren zu können, wurde vor dem Abgleich der Illumina-Daten an die Referenzsequenzen von Phelipanche eine cDNA-Bank von Arabidopsis angehängen (Abb. 9 u. 12). Es wurden keine späteren Entwicklungsstadien, in denen Tabak als Wirtspflanze diente betrachtet. Daher wurde darauf verzichtet, die gleiche Verfahrensweise für Tabak anzuwenden.



**Abbildung 12**

Ablauf der Expressionsanalyse: Illumina-Rohdaten (1) wurden gefiltert und Sequenzen unterhalb der Qualitätsanforderungen wurden aussortiert (2). Verbleibende Sequenzen (3) wurden der Referenz zugeordnet (4), welche aus dem assemblierten Phelipanche-Transkriptom und der Arabidopsis cDNA Bibliothek besteht.



## II Ergebnisse

Für das Alignment der cDNA-Sequenzen aus den verschiedenen Geweben von Phelipanche wurden die Daten der Illumina-Sequenzierungen verwendet, da zum einen nicht für alle Gewebe Roche454-Daten verfügbar waren und die Illumina-Sequenzierungen deutlich mehr reads ergaben. Dies erhöht die Chance, auch die Expression schwächer exprimierter Transkripte zuverlässig zu bestimmen. Beim Prozess des Alignments wird jede der Millionen Illumina-Sequenzen eines Datensatzes mit jeder der Sequenzen in der Referenz abgeglichen. Jede Illumina-Sequenz wird auf diese Weise der ähnlichsten Sequenz in der Referenz zugeordnet. Es können auf diese Weise Kontaminationen durch RNA des Wirtes während des Alignmentprozesses identifiziert und isoliert werden. Nach dem Alignment wurde daher das Verhältnis von reads, die der Arabidopsis cDNA und jenen, die dem Phelipanchetranskriptom zugeordnet worden waren gebildet (Tabelle 1).

**Tabelle 1**

Prozentualer Anteil der reads die Arabidopsis (Ara.) cDNA Sequenzen zugeordnet wurden im Verhältnis zu jenen für Phelipanche (Phe.). Datensätze von Phelipanche-Entwicklungsstadien, die schon Kontakt mit einer Wirtspflanze hatten sind grau unterlegt.

Entwicklungsstadium von <i>P. aegyptiaca</i>	Datensatzname	Ara. / Phe. in %
Keimung induziert	OrAe0G	0,29
Keimende Samen mit Keimwurzel	OrAe1G	1,25
Keimlinge nach Kontakt zu <i>Arabidopsis</i> Wurzeln nach 6, 12 und 24 h	OrAe2G	0,81
Haustorien mit dem Wirt verbunden, keine Verbindung zu den Leitbündeln	OrAe3G	12,89
Frühes vegetatives Wachstum nach Verbindung zu Leitbündeln	OrAe4.1G OrAe4.1G2	2,50 3,02
„Spinnen Stadium“	OrAe42G	1,88

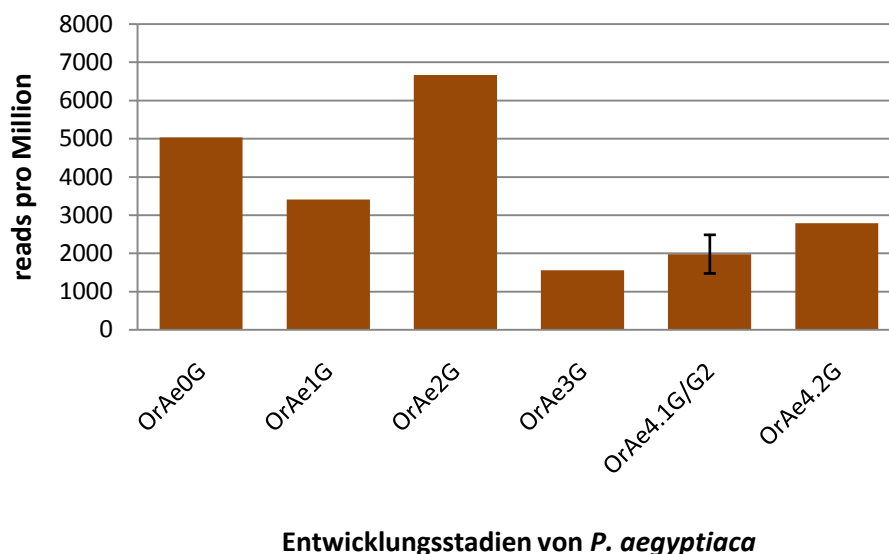
In allen Datensätzen wurden reads den Arabidopsis-Sequenzen zugeordnet, auch bei Keimlingen, die bis dahin keinen Kontakt zu Arabidopsis gehabt hatten. Es muss daher von einer entsprechenden Fehlerquote bei dieser Methode ausgegangen werden, die allerdings mit Werten zwischen 0,29 und 1,25% sehr gering ausfällt und für die Gesamtmenge zugeordneter reads nicht ausschlaggebend ist. Dennoch wurden Transkripte aus der Arabidopsis cDNA-Bank, denen reads zugeordnet worden waren, einer Überprüfung unterzogen. Dies sollte vor allem sicherstellen, dass sich darunter keine Gene für Cysteinproteasen befanden, wodurch eine stärkere Verfälschung des Ergebnisses hätte zustande kommen können. Dabei wurden zunächst Datensätze von Phelipanche-Entwicklungsstadien betrachtet, die noch keinen Kontakt zu Wirtspflanzen hatten (OrAe0G, OrAe1G). Es handelte sich

## II Ergebnisse

bei dem überwiegenden Teil von Arabidopsis cDNA zugeordneten reads um eukaryotische, mitochondrielle und plastidäre rRNA. Solcherlei Arabidopsis Sequenzen wurden auch reads von cDNA zugeordnet, die aus dem Gewebe sich bildender Haustorien stammt (OrAe3G), also Phelipanche, die direkten Kontakt zur Wirtspflanze hatte. Allerdings fanden sich in diesem Datensatz auch in größerer Anzahl reads, die Sequenzen von Arabidopsis-mRNA zugeordnet worden waren. In keinem der Alignments wurden jedoch in nennenswertem Maße reads gefunden, die cDNA von Cysteinproteasen aus Arabidopsis zugeordnet wurden.

### 1.4.1 Expressionsanalyse von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca*

Die 20 zu Cuscutain ähnlichsten Transkripte wurden bezüglich ihrer Expression während der verschiedenen Entwicklungsstadien von *P. aegyptiaca* genauer betrachtet. Es wurden jeweils die den Sequenzen zugeordneten reads gezählt. Diese wurden dann durch die Zahl der dem gesamten Transkriptom zugeordneten reads dividiert. Dieses Verhältnis der Cysteinproteasetranskripte zur gesamten Transkriptmenge wurde mit  $10^6$  multipliziert und somit normiert. Es ergibt sich die Anzahl Cysteinproteasen zugeordneter reads pro einer Mio. (rpm) dem Transkriptom zugeordneter reads.



**Abbildung 13**

Anzahl der reads, die den untersuchten Sequenzen der im Phelipanchetranskriptom gefundenen Cysteinproteasen in verschiedenen Entwicklungsstadien zugeordnet wurden. Die Anzahl wurde jeweils auf eine Mio. dem gesamten Transkriptom zugeordneter reads normiert.

OrAe0G: Keimung induziert; OrAe1G: Keimende Samen mit Keimwurzel; OrAe2G: Keimlinge nach Kontakt zu Arabidopsis Wurzeln nach 6, 12 und 24 h; OrAe3G: Haustorien mit dem Wirt verbunden, keine Verbindung zu den Leitbündeln; OrAe4.1G/G2: Frühes vegetatives Wachstum nach Verbindung zu Leitbündeln, Fehlerbalken zeigt Durchschnitt und Standardabweichung beider Datensätze; OrAe4.2G: ‚Spinnen Stadium‘.

## II Ergebnisse

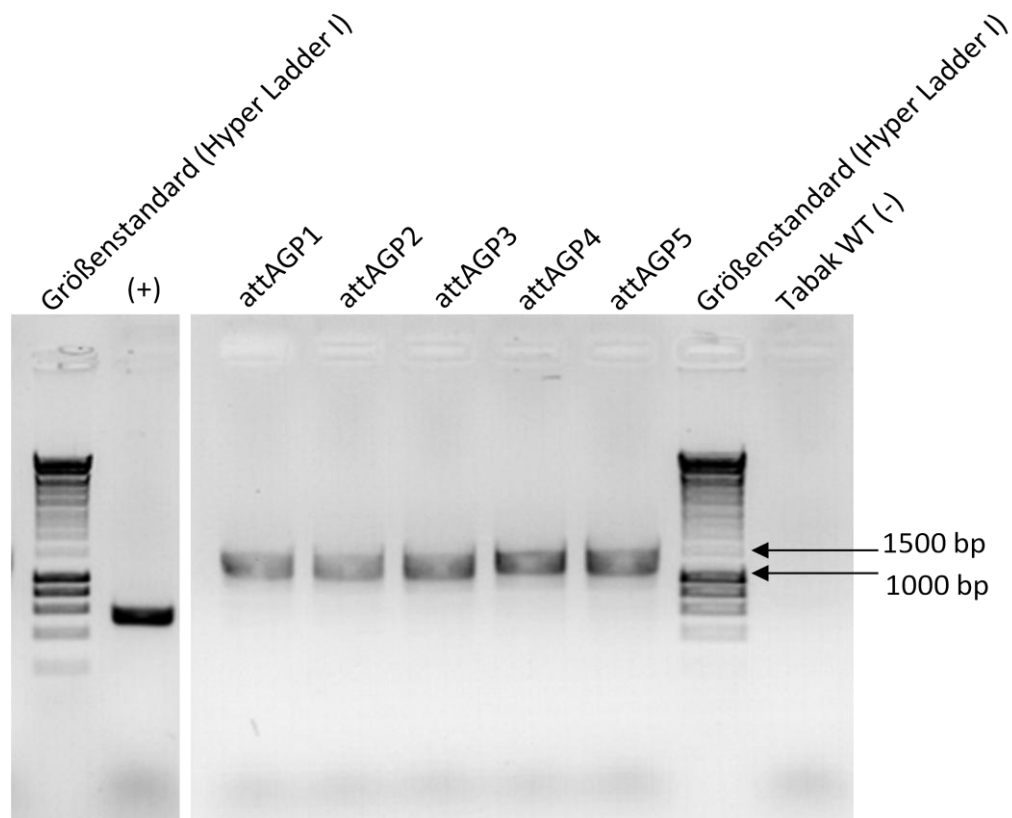
Die Expression der analysierten Entwicklungsstadien startet mit einem hohen Level von 5032,7 zugeordneten reads für die betrachteten Cysteinproteasen, nachdem die Keimung induziert wurde (OrAe0G). Dieser nimmt mit der Keimung auf 3413,4 reads ab (OrAe1G), erhöht sich aber sprunghaft auf 6671,5 reads, sobald die Keimlinge für kurze Zeit (6, 12 u. 24 h) in Kontakt mit Wurzeln von *A. thaliana* waren (OrAe2G). Nimmt man diesen höchsten Wert als 100%, ergeben sich für die Samen von Phelipanche (OrAe0G) 75,4% und für die Keimlinge (OrAe1G) 51,2%. In den weiteren Stadien nach der Infektion ist der Transkriptlevel demgegenüber deutlich geringer. Keimlinge, welche Haustorien gebildet, aber noch keinen Kontakt zu den Leitbündeln hergestellt hatten (OrAe3G) lagen bei 23,4%, bzw. 1561,3 reads. War der Kontakt zum Leitbündel etabliert (OrAe4.1G/G2) ergaben sich 29,7%, bzw. 2345,2 reads und bei einem Tuberkel im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium (OrAe4.2G) 41,8%, bzw. 1631,2 reads.

### 1.5 Transformation von Tabak mit PrePropeptid-Konstrukten

Um die Effektivität des Propeptides bei der Abwehr der parasitären Pflanzen *C. reflexa* und *P. aegyptiaca* zu untersuchen, wurde Tabak mittels *A. tumefaciens* transformiert. Zwar wurde das Propeptid bereits durch Marc Bleischwitz hinsichtlich seiner Wirkung auf *Cuscuta* untersucht, jedoch wurde der Inhibitor in diesen Versuchen von außen auf die Wirtspflanzen aufgebracht. Für einen Wurzelparasiten wie Phelipanche ist ein solches Vorgehen weniger dienlich, da Polypeptide im Boden schnell durch die dort vorhandenen Mikroorganismen abgebaut werden. In Vorversuchen mit dem isolierten Propeptid erwies sich die externe Applikation als unwirksam (Radi Aly, persönliche Kommunikation). Die transformierten Konstrukte beinhalteten das PrePropeptid aus *C. reflexa*, dessen Expression entweder vom 35S- oder vom attAGP-Promotor gesteuert wurde. Nach der Regeneration aus Kallus erhielt man 38 verschiedene Linien für das 35S-PrePro-Konstrukt und 12 für das attAGP-PrePro-Konstrukt.

Es wurde DNA des attAGP-PrePro-Tabaks isoliert um die Pflanzen auf eine erfolgreiche Transformation hin zu überprüfen. Durch eine PCR mit Primern die an die DNA-Sequenz von attAGP-Promotor und Propeptid binden, konnten Banden in der erwarteten Größe von 1290 bp mit DNA aus den mit dem entsprechenden Konstrukt transformierten Pflanzen amplifiziert werden (Abb. 14). DNA aus Wildtyp Tabak zeigte bei der PCR keine Banden.

## II Ergebnisse



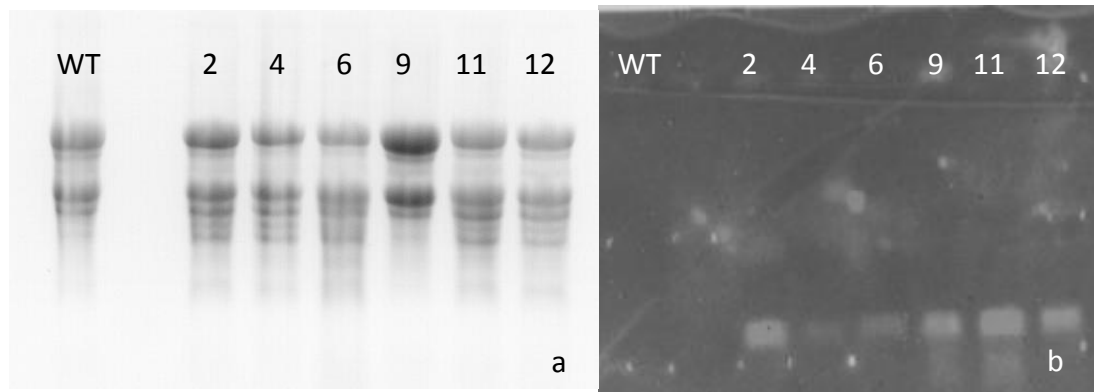
**Abbildung 14**

Nachweis der attAGP-PrePro Sequenz in genomischer DNA aus den transformierten Tabakpflanzen. (+): Positivkontrolle für die PCR-Reaktion; attAGP1-5: attAGP-PrePro Linien 1-5; Tabak WT (-): nicht transformierter Wildtyp Tabak als Negativkontrolle.

Da die 35S-PrePro-Konstrukte zu einer konstitutiven Expression des PrePropeptids führen sollten, wurde hier die Produktion von Transkripten mittels Northern Blot überprüft. Dabei konnte für alle getesteten Pflanzen das Transkript nachgewiesen werden (Abb. 15).

Es dauerte im Falle des attAGP-PrePro-Konstrukts ca. 3 Monate, bis sich aus dem Kallus die ersten Sprosse bildeten. Diese Phase begann bei den 35S-PrePro-Konstrukten schon nach 5 Wochen. Weder die mit den Konstrukten transformierten und regenerierten Pflanzen, noch ihre für die Versuche verwendeten Nachkommen zeigten nach dieser Phase in Wachstumsgeschwindigkeit oder Morphologie offensichtliche Unterschiede zum Wildtyp.

## II Ergebnisse



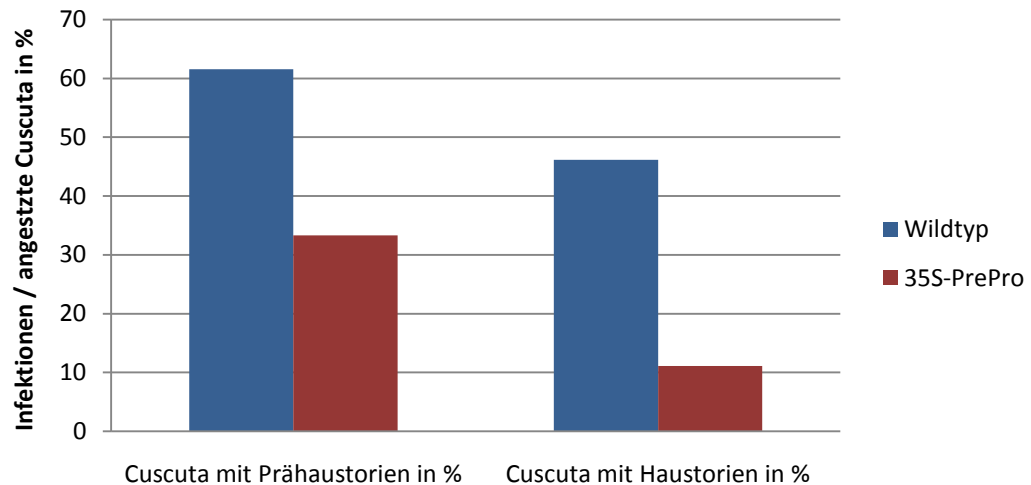
**Abbildung 15**

RNA von 6 mit dem 35S-PrePro-Konstrukt transformierten Tabakpflanzenlinien wurde isoliert und mit einer mittels Digoxigenin markierten Sonde gegen die PrePro-Sequenz hybridisiert. WT: nicht transgene Kontrollpflanze; Nummer 2, 4, 6, 9, 11, 12: Verschiedene transgene Linien. a) 2 µg RNA wurden auf einem 1% MEN-Gel aufgetrennt. b) Detektion mit einer Digoxigenin markierten DNA-Sonde der PrePro-Sequenz.

### 1.6 Infektion des transformierten Tabaks durch *Cuscuta*

Der mit dem 35S-PrePro-Konstrukt transformierte Tabak wurde zunächst auf Anfälligkeit gegenüber *C. reflexa* hin untersucht. Transformierte Tabakpflanzen wurden hierzu mit Sprossen von *C. reflexa* umwickelt und die Infektionsrate sowie die Ausbildung von Vorläuferstadien der Haustorien, sog. Prehaustorien, nach jeweils 10 Tagen bestimmt. War die Infektion erfolgreich, wurden innerhalb von 2-3 Tagen zunächst Prehaustorien, welche sich an einer Verdickung des Cuscutasprosses und einer Anheftung an die Wirtspflanze erkennen lassen, ausgebildet. Nach 6-10 Tagen hatte *Cuscuta* Haustorien ausgebildet, womit ein schlagartig einsetzendes vegetatives Wachstum verbunden war. Cuscutasprosse mit Haustorien ließen sich nur mit deutlich mehr Kraftaufwand von der Wirtspflanze trennen, als jene die nur Prehaustorien entwickelt hatten. Zudem lässt sich das Haustorium an der dabei entstehenden Verwundung von Wirtspflanze oder *Cuscuta* erkennen. Als Kontrolle wurden Wildtyp Pflanzen in gleicher Weise untersucht. Der Versuch wurde im April 2009 durchgeführt.

## II Ergebnisse



**Abbildung 16**

Infektionsrate von mit *C. reflexa* infiziertem *N. tabacum*. 61,5% der Cuscuta-Sprosse bildeten auf den Kontrollpflanzen (Wildtyp) Prehaustorien aus und 46,2% konnten die Tabakpflanzen erfolgreich infizieren. Auf 35S-PrePro-Tabak wurden auf 33,3% der Wirtspflanzen Prehaustorien ausgebildet und auf 11,1% Haustorien.

Bei nicht transformiertem Tabak konnten bei 16 von 26 mit Cuscuta umwickelten Sprossen Prehaustorien und darunter wiederum 12 mit entwickelten Haustorien festgestellt werden. Dies entspricht 61,5%, bzw. 46%. Bei den 27 mit dem 35S-PrePro-Konstrukt transformierten Tabakpflanzen fanden sich 9 mit Prehaustorien und 3 mit Haustorien, entsprechend 33,3% bzw. 11,1% (Abb. 16).

Der Versuch wurde im August des gleichen Jahres wiederholt. Jedoch zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenem Tabak.

### 1.7 Infektion durch Phelipanche im *in vitro polybag*-System

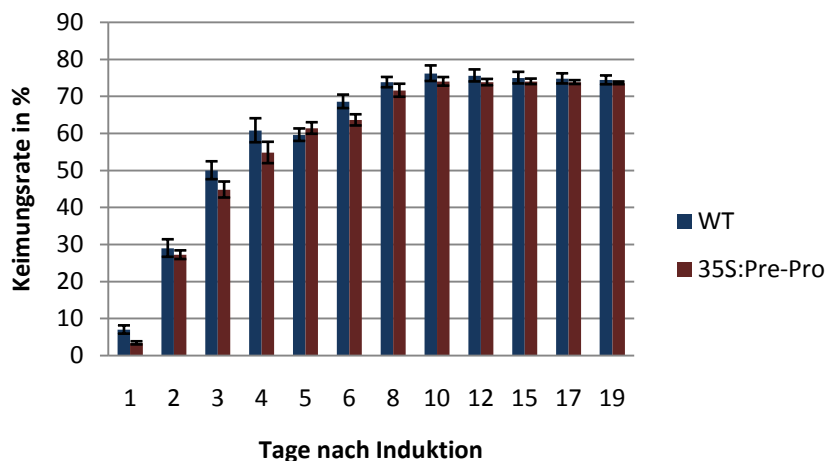
Die transgenen Tabakpflanzen wurden auf Anfälligkeit gegenüber *P. aegyptiaca* zunächst im *in vitro polybag*-System (Parker & N. Dixon 1983) getestet. Für das attAGP-PrePro-Konstrukt wurde dafür Linie 1 getestet, für das 35S-PrePro-Konstrukt Linie 6. Beide hatten sich in Vorversuchen als am wenigsten anfällig erwiesen.

#### 1.7.1 Keimung der Phelipanchesamen

Um einen Effekt der transgenen Pflanzen auf Keimung und Infektionsrate der Parasiten zu untersuchen, wurde mittels eines wasserfesten Stiftes ein Gitter auf die Autoklavierbeutel gezeichnet. In jeweils willkürlich gewählten Bereichen, die für

## II Ergebnisse

jeden Beutel über die Versuchsdauer dieselben blieben, wurde die Keimungsrate der *Phelipanchesamen* ermittelt. Bei Betrachtung der Keimungsrate gegenüber der Zeit ergibt sich eine Sättigungskurve. Diese erreichte in den verschiedenen Experimenten nach 3-10 DAI (days after induction / Tage nach Induktion durch GR24) mit 75,1%-91,9% ihren Höhepunkt. Es zeigten sich dabei jeweils nur geringe und nicht signifikante Differenzen zwischen transgenem Tabak und Wildtyp. Samen, die in der unmittelbaren Nähe von Wirtswurzeln oder direkt darauf lagen, zeigten keine erkennbaren Unterschiede in der Keimungswahrscheinlichkeit zu jenen, die sich weiter entfernt vom Wirt befanden, weder im Wildtyp noch in den transgenen Pflanzen. Es konnte allerdings ein zeitlicher Effekt auf die Geschwindigkeit und Rate der Keimung festgestellt werden. In Experimenten ca. ein halbes Jahr später, welche die attAGP-PrePro-Pflanzen und ihre Wildtypkontrolle betrafen, waren beide Parameter verringert.



**Abbildung 17**

Keimungsrate von *P. aegyptiaca* im *in vitro polybag*-System nach Konditionierung für 10 Tage und Induktion mittels 2 ppm GR24. Fehlerbalken: Standardabweichung

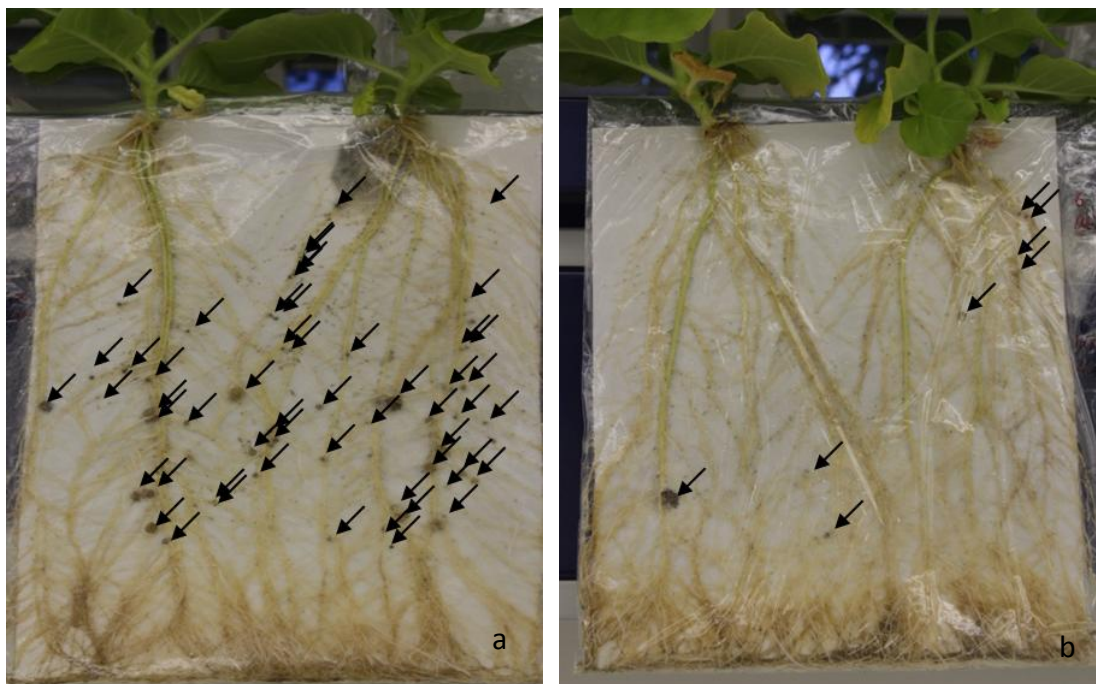
### 1.7.2 Infektion und Tuberkelbildung

Die ersten Tuberkel wurden nach 8-11 Tagen beobachtet. Der in Bezug auf die Keimungsrate und ihrer Geschwindigkeit beobachtete Effekt des Zeitpunktes des Experimentes zeigte sich auch bei der Infektion und den darauf folgenden Entwicklungsstadien von *Phelipanche*. Der Versuch wurde mit den Pflanzen mit dem 35S-Prepro-Konstrukt dreimal wiederholt. Zunächst mit jeweils 5 transgenen und 5 Kontrollpflanzen, der zweite mit je 10 und der dritte mit 11 und 13 Pflanzen. Sowohl das attAGP-PrePro-Konstrukt als auch das 35S-PrePro-Konstrukt konnten in damit

## II Ergebnisse

transformiertem Tabak gegenüber zeitgleich infizierten Wildtyppflanzen die durchschnittlichen Infektionsraten verringern.

Die maximalen Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen zeigten sich mit 22,6% der Infektionen (10 DAI) für das 35S-PrePro-Konstrukt und 40,8% für das attAGP-PrePro-Konstrukt (15 DAI) gegenüber dem Wildtyp (Abb. 19 u. 20). Die minimalen Unterschiede konnten für das 35S-PrePro-Konstrukt bei 52,5% (21 DAI) und für das attAGP-PrePro-Konstrukt bei 63,6% festgestellt werden. Nach einer erfolgten Infektion zeigten sich zwischen *Phelipanchetuberkeln*, die Wildtyp oder transgene Pflanzen befallen hatten keine Unterschiede in Form und Geschwindigkeit der Ausbildung der verschiedenen Entwicklungsstadien. Auch nekrotische Tuberkel, die durch eine dunkle Verfärbung noch vor Ausbildung eines Sprosses identifiziert wurden, traten auf attAGP-PrePro, 35S-PrePro und Wildtyp Tabak gleichmäßig oft und mit der Gesamtinfektionsrate der jeweiligen Pflanzen korrelierend in Erscheinung.

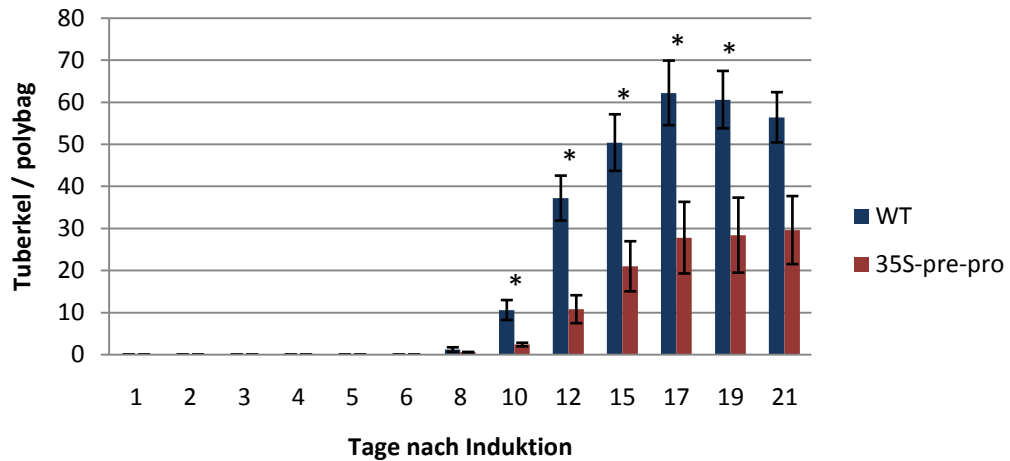


**Abbildung 18**

a) Infektion von Tabak Wildtyp und b) 35S-PrePro transgenen Pflanzen im *in vitro polybag*-System (21 DAI). Pfeile zeigen sich entwickelnde Tuberkel von *Phelipanche* an.

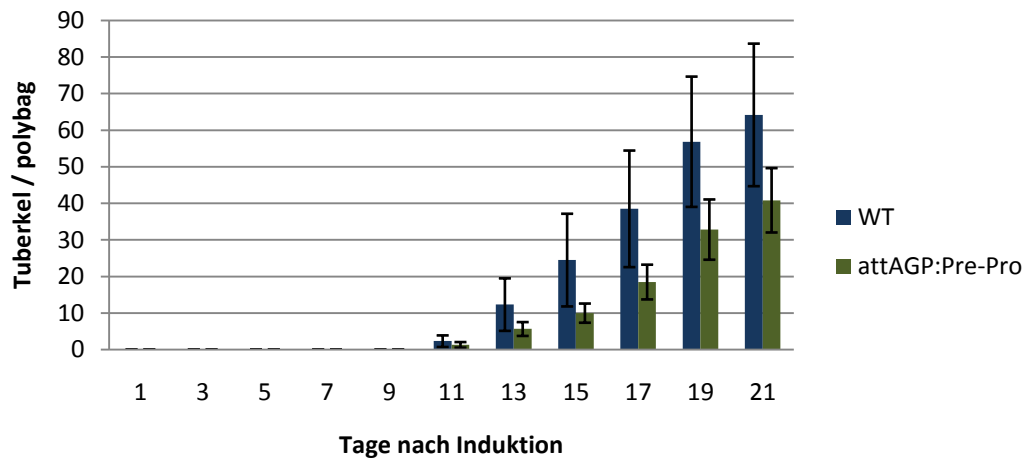


## II Ergebnisse



**Abbildung 19**

Phelipanchetuberkel im *in vitro polybag*-System mit Tabak Wildtyp (WT) und 35S-PrePro transgenem Tabak. N=10; 0,1g Phelipanchesamen / Polybag; \* laut studentischer t-Verteilung ( $\alpha=0,05$ ) signifikant unterschiedlich; Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

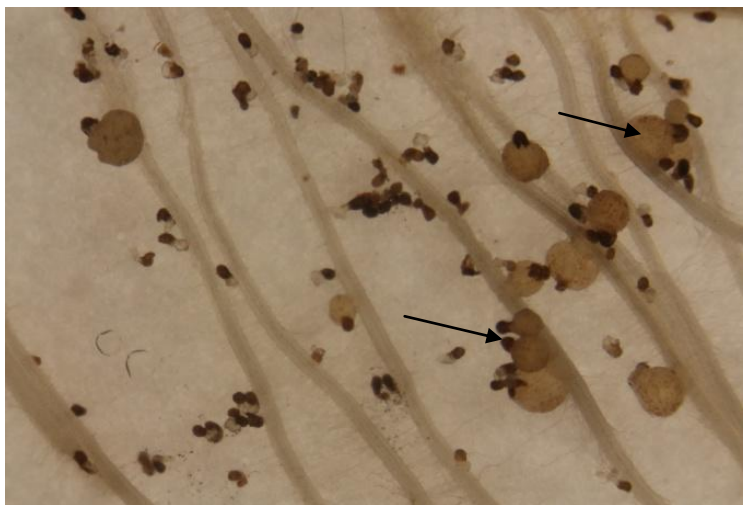


**Abbildung 20**

Phelipanchetuberkel im *in vitro polybag*-System mit Tabak Wildtyp (WT) und attAGP-PrePro transgenem Tabak. N=6; 0,1g Phelipanchesamen / Polybag; Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

## II Ergebnisse

Es ist beim 35S-Konstrukt zu erkennen, dass die Anzahl der beobachteten Tuberkel ab 17 DAI wieder zurückgeht (Abb. 19). Dies lässt sich durch das Wachstum einzelner Tuberkel erklären, die dadurch andere, sich nahe an ihrer Infektionsstelle später oder langsamer entwickelnde Tuberkel teilweise oder ganz überdecken (Abb. 21). Dieser Effekt war bereits wenige Tage, nachdem die ersten Infektionen beobachtet werden konnten, optisch feststellbar. Er nahm mit der Anzahl der Infektionen weiter zu, so dass ein Zählen der verdeckten Tuberkel nicht mehr möglich war. Eine Reduzierung der pro Einzelexperiment eingesetzten Samenmenge könnte diesen Effekt verringern.



**Abbildung 21**

Phelipanchetuberkel nach der Infektion von *N. tabacum* Wurzeln im *in vitro polybag*-System (15 DAI). Pfeile deuten Bereiche mit unterschiedlich großen Tuberkeln an, die sich zum Teil schon gegenseitig überdecken.

### 1.7.3 Anfälligkeit der Tabakpflanzen gegenüber Phelipanche in Erde

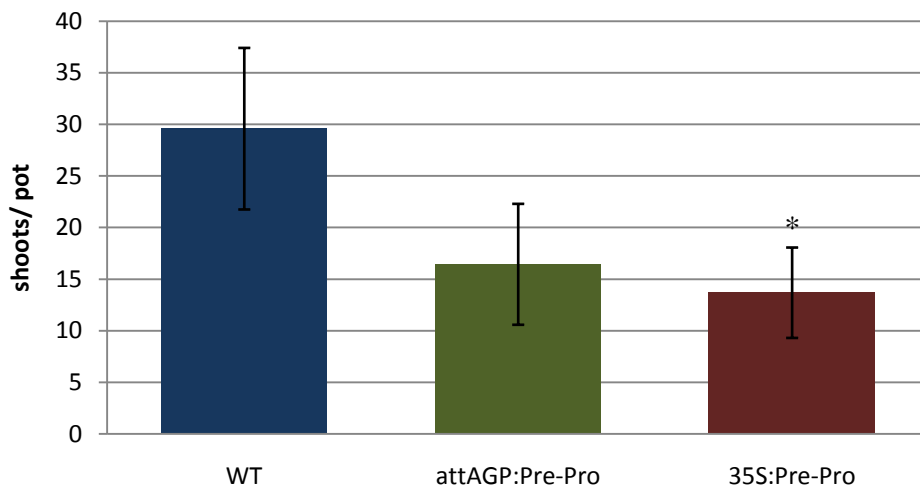
Da es sich beim *in vitro polybag*-System um einen für Phelipanche und Tabak künstlichen Lebensraum handelt, wurden die Versuche zusätzlich in Erde wiederholt. Hierzu wurden Blumentöpfe mit 3 l Erde gefüllt, welche mit 40 mg / l *P. aegyptiaca*-Samen versetzt worden war. Den Beginn des Versuchs markierte das Einpflanzen von jungen transgenen und Wildtyp-Tabaksetzlingen in die kontaminierte Erde. Die ersten Sprosse von Phelipanche zeigten sich 8-9 Wochen nach dem Einpflanzen. Die Auswertung des Versuchs geschah 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Hierzu wurden die Phelipanchesprosse, welche sich während dieser Zeit gebildet hatten, ausgegraben und gezählt.

## II Ergebnisse



**Abbildung 22**

a) Tabakpflanzen, die das 35S-PrePro-Konstrukt und b) das attAGP-PrePro-Konstrukt ins Genom integriert hatten, wurden in Blumentöpfen kultiviert. Die Erde wurde mit 40 mg *P. aegyptiaca*-Samen / l versetzt. Die Bilder zeigen Beispiele für oberirdische Sprosse von Phelipanche. Das Stadium zeigt Pflanzen 10 Wochen nach dem Vereinzeln der Tabakkeimlinge in die kontaminierte Erde. c) Als Kontrolle wurde das Experiment zusätzlich mit Tabak Wildtyp durchgeführt.



**Abbildung 23**

*P. aegyptiaca*-Sprosse in Blumentöpfen mit Tabak Wildtyp (WT) und PrePro transgenem Tabak (PrePro) unter Kontrolle des attAGP- und 35S-Promotor. N(WT)=7; N(attAGP)=7; N(35S)=9; 40 mg Phelipanchesamen / l Erde; \* laut studentscher t-Verteilung ( $\alpha=0,05$ ) signifikant unterschiedlich; Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

## II Ergebnisse

Im Durchschnitt konnten dabei 29,6 Sprosse pro Topf für die Wildtyp Tabakpflanzen gezählt werden. Mit dem attAGP-PrePro-Konstrukt transformierte Pflanzen führten zu 16,4 Sprossen pro Topf, was 56,6% der am Wildtyp beobachteten Infektionen entspricht. Das 35S-Prepro-Konstrukt führte zu einer signifikanten Reduzierung der Infektionsrate auf 13,7 Sprosse, entsprechend 46,3%. Insgesamt konnten für den Wildtyp-Tabak 207 Sprosse gezählt werden, für attAGP- und 35S-Prepro-Konstrukte jeweils 115 Sprosse. Die Zahl der ausgewerteten Tabakpflanzen betrug 7, 7 und 9 für Wildtyp, attAGP-PrePro und 35S-Prepro-Konstrukt. Es konnten auch hier vereinzelt nekrotische Tuberkel identifiziert werden. Die Verteilung auf die einzelnen Wirtspflanzen entsprach dabei in etwa der jeweiligen Infektionsrate.

### **III. Diskussion**

Während der Evolution hat sich Parasitismus im Pflanzenreich mehrfach und unabhängig in verschiedenen Pflanzenfamilien entwickelt (Barkman et al. 2007). Dennoch beruht dieser zum Teil auf gemeinsamen Strategien für die Infektionsmechanismen. Umgekehrt sind die Reaktionen und Abwehrreaktionen der Wirtspflanzen oft auch nicht auf eine Gattung oder gar Familie von Parasiten beschränkt. Vielmehr scheinen sie sich auf Art und Methodik des Angriffs zu beziehen. Aus biotechnologischer Sicht lohnt sich daher die Suche nach Gemeinsamkeiten, da sich dahinter mit großer Wahrscheinlichkeit für den Parasitismus oder dessen Abwehr essentielle Eigenschaften verbergen.

#### **1.1 Induktion des attAGP-Promotors**

Eine nähere Charakterisierung des attAGP-Promotors in Bezug auf seine Induzierbarkeit ist von Vorteil, um seine eventuelle biotechnologische Eignung für die Abwehr von Pflanzenpathogenen festzustellen. Daher wurden verschiedene in Betracht kommende Faktoren auf ihren Zusammenhang mit der Induktion untersucht.

##### **1.1.1 Induktion des attAGP-Promotors durch *Phelipanche***

Wie gezeigt werden konnte, induzierte der Befall von *S. lycopersicum* durch *P. aegyptiaca* den attAGP-Promotor (Abb. 7). Dies ist auch bei dem Sprossparasiten *C. reflexa* der Fall (Albert et al. 2006). Es stellt sich somit die Frage, ob dies durch ähnliche Auslöser geschieht oder unabhängig voneinander wirkende Faktoren verantwortlich sind.

AGPs spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Zellwandsynthese chimärer Zellwände zwischen verschiedenen Organismen, wie sie z.B. auch bei der Interaktion von *A. tumefaciens* mit Pflanzenzellen vorkommen (Gaspar et al. 2004). Dies wäre somit auch für die Interaktion parasitärer Pflanzen mit ihrem Wirt denkbar. Zhang et al. (2003) konnten die Expression eines AGPs während der Ausbildung von sekundärer Zellwand bei der Xylembildung beobachten. Auch die Reaktion von Tomaten auf den Versuch, diese mit *Cuscuta* zu infizieren, induziert sowohl die Expression von attAGP als auch die Synthese von sekundärer Zellwand (Albert et al. 2006). In letzterem Falle handelt es sich jedoch nicht wie im Xylem um Lignin, sondern um

### III Diskussion

Suberin, mit dem die Infektion abgewehrt wird. Mit Lignin und Suberin verstärkte Zellwände konnten in gegenüber *Orobanch*e resistenten Wirtspflanzen, angrenzend zum eindringenden Haustorium, bereits nachgewiesen werden (Goldwasser et al. 1999; Echevarría-Zomeño et al. 2006). Da attAGP also in die Synthese von sekundärer Zellwand involviert sein könnte, wäre auch eine Regulation über die lytischen Enzyme von *Cuscuta* und *Phelipanche* während des Einwachsens in die Wirtspflanze vorstellbar. Die Pflanze könnte auf diese Weise die Infektion verlangsamen oder wie im Falle von *Cuscuta* und *S. lycopersicum* ganz stoppen. Es wurde daher der Versuch unternommen, die Aktivität des Promotors mit Zymolyase zu induzieren, da dieses Enzymgemisch sowohl Pektinase als auch Cellulase enthält. Die Pflanze sollte auf diese Weise zur Aktivierung der oben beschriebenen Schutzmechanismen veranlasst werden. Dies führte in dieser Arbeit allerdings nicht zur Aktivierung des attAGP-Promotors.

Mittels Hefeextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich in Pflanzen die Expression von Genen induzieren, die der Abwehr von pathogenen Pilzen dienen (Herget et al. 1990). Diese dringen ebenso wie das Haustorium der parasitären Pflanzen mit ihren Hyphen ebenfalls in die Wirtspflanze ein. So wird z.B. durch Hefeextrakt die Synthese der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) induziert (Suzuki et al. 2005). Bei der Spaltung von Phenylalanin durch PAL wird Ammoniak und Zimtsäure freigesetzt. Letztere kann von der Pflanze dann zum Aufbau sekundärer Zellwand und damit gegen das Einwachsen von pathogenen Pilzen genutzt werden. Eine Induktion des attAGP-Promotors durch Hefeextrakt im Medium wurde nicht beobachtet. Es konnte somit auch kein Hinweis auf weitere auf diese Weise nachweisbare pilzliche Elicitoren gefunden werden.

Dass sich der attAGP-Promotor nicht mittels der verwendeten lytischen Enzyme oder Hefeextrakt aktivieren ließ, schließt eine potentielle Rolle bei der Zellwandsynthese dennoch nicht aus. Die Aktivierung könnte eher indirekt über unbekannte Faktoren geschehen, welche dann die Expression von attAGP induzieren.

#### 1.1.2 Induktion des attAGP-Promotors durch Phytohormone

Der attAGP-Promotor enthält auxinregulatorische Elemente (Albert 2005), z.B. eine Bindestelle für sogenannte *Auxin response factors* (TGTCTC; CATGCA). Die Konzentration von Auxin ist an der Infektionsstelle sowohl auf Seiten von *Cuscuta* als auch des Wirtes erhöht (Löffler et al. 1999). Eine erhöhte Expression von Proteinen, welche durch Auxin regulierbar sind, konnte ebenfalls durch Infektion mit *Cuscuta* nachgewiesen werden (D. Li et al. 2009). In *Orobanchaceae* spielt Auxin

### III Diskussion

eine wichtige Rolle während der Infektion. So konnten beispielsweise mittels Naphthylphthalamin-Säure (NPA), welche den Transport von Auxin inhibiert, die Infektionsraten durch *P. aegyptiaca* verringert werden (Bar-Nun et al. 2008). Des Weiteren lassen sich in *Triphysaria versicolor* mittels des Haustorien induzierenden Faktors (HIF) 2,6-Dimethoxybenzochinon mehr Haustorien in Wurzelspitzen induzieren, wenn diese gleichzeitig mit extern applizierter Indol-3-Essigsäure (IAA) in Kontakt stehen (Tomilov et al. 2004). Zur Bildung von Seitenwurzeln in der Wirtspflanze ist ebenfalls eine lokal erhöhte Akkumulation von Auxin notwendig (Rowntree & Morris 1979; Reed et al. 1998). All dies könnte den Zusammenhang mit der gelegentlich beobachteten Induktion des attAGP-Promotors in sich bildenden Seitenwurzeln von *S. lycopersicum* herstellen. Allgemein geht schnelles Wachstum und Zellteilung in Pflanzen, wie man es auch im Haustorium beobachten kann, mit einer erhöhten Auxinkonzentration einher. In dieser Arbeit konnte über externe Applikation der beiden Auxinanaloga NAA und 2,4-D nachgewiesen werden, dass der attAGP-Promotor durch diese aktiviert werden kann (Abb. 8). Wahrscheinlich handelt es sich also beim Auxin um eine beiden parasitären Pflanzen gemeinsame Substanz, welche die Aktivität des attAGP-Promotors auslöst.

Salicylsäure konnte den attAGP-Promotor ebenfalls induzieren. Dieses Phytohormon ist ebenso wie Jasmonsäure dafür bekannt, in Pflanzen Verteidigungsmechanismen gegen Phytopathogene zu aktivieren. So verringert die Applikation von Salicylsäure in *Trifolium pratense* die Infektion durch *P. ramosa* (Kusumoto et al. 2007). Jedoch wird dieser Signalweg in *A. thaliana* durch *P. ramosa* nicht induziert (Vieira Dos Santos et al. 2003), wohl aber z.B. in *S. lycopersicum* durch *C. pentagona* (Runyon et al. 2010). Eine Verstärkung der Induktion des attAGP-Promotors in mit *C. reflexa* infizierten Pflanzen erscheint somit über Salicylsäure denkbar. Weiterhin ist dies ein Hinweis, dass attAGP tatsächlich in die Verteidigung gegen Phytopathogene involviert ist und nicht nur durch den Einfluss der lokal erhöhten Auxinkonzentration von *Phelipanche* und *Cuscuta* zufällig mit induziert wird.

#### 1.2 Analyse von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca*

Cysteinproteasen scheinen nicht nur für *Cuscuta* relevant zu sein, sondern auch für andere parasitäre Organismen. So ist bereits gezeigt worden, dass von besonders infektiösen Stämmen des parasitären Protozoen *Trypanosoma cruzi* ein erhöhter Level von Cruzipain sezerniert wird (Fampa et al. 2010). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, in welcher Weise Cysteinproteasen für den Wurzelparasiten *Phelipanche* eine Rolle spielen.

### III Diskussion

Durch das Assemblieren des Transkriptoms von *P. aegyptiaca* konnten mRNA-Sequenzen rekonstruiert werden, die alle drei funktionellen Domänen des Cuscutains, also Prepeptid, Propeptid und die Cysteinprotease selbst aufweisen (Abb. 10). Die insgesamt hohe Ähnlichkeit ist dabei besonders im Bereich der Domänen für Propeptid und Cysteinprotease gegeben, also jenen Teilbereichen des Proenzym, die miteinander interagieren. Dies und die vergleichbaren Hindernisse, die von beiden Parasiten während der Infektion der Wirtspflanze überwunden werden müssen, legen die Vermutung eines ähnlichen Substratspektrums und einer ähnlichen Funktion in der Pflanze nahe. Mit *S. lycopersicum* für *Cuscuta* und *N. tabacum* für *Phelipanche* finden sich allerdings nah verwandte nicht parasitäre Pflanzen. Diese besitzen Cysteinproteasen, die dem jeweiligen parasitären Enzym noch ähnlicher sind (Daten nicht gezeigt). Es besteht daher die Möglichkeit, dass beim Evolutionsschritt von *Cuscuta* und den Orobanchaceae hin zum Parasitismus eine Regulation schon vorhandener Gene und weniger deren strukturelle Anpassung geschehen ist.

Der Vergleich mit weiteren Peptidsequenzen bekannter Cysteinproteasen, wie Bromealin oder Papain, zeigte deutliche Unterschiede zu den Cysteinproteasen der beiden parasitären Pflanzen (Abb. 11). Dies könnte eine Erklärung für die von Bleischwitz et al. (2010) ermittelte geringe Inhibitionswirkung des Propeptides von Cuscutain auf Bromealin und Papain sein.

#### 1.3 Überprüfung der Zuordnung der Sequenzierungsdaten zu *Phelipanche* oder *Arabidopsis* cDNA

Die Isolation von genügend mRNA aus *Phelipanche* gestaltet sich gerade in den Anfangsstadien der Infektion aufgrund der Größenverhältnisse schwierig. Es besteht die Gefahr, Gewebe und damit RNA aus dem Wirt in die Probe zu verschleppen. Dies könnte zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Daher wurde vor dem Alignment der Illumina-Daten ein Transkriptom von *Arabidopsis* an das *Phelipanchetranskriptom* angefügt, um solche Kontaminationen abzufangen.

Vor der Expressionsanalyse von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca* wurde nun zunächst das Verhältnis zwischen reads die dem *Phelipanchetranskriptom* und jenen die dem *Arabidopsistranskriptom* zugeordnet worden waren, bestimmt (Tab. 1). Neben den Kontaminationen durch die Wirtspflanze kann dies ein Hinweis sein, wie gut die assemblierten *Phelipanchebibliotheken* das reale Transkriptom repräsentieren. Da *Arabidopsis* seit langem als Modellorganismus dient, kann man von weitaus besserer Qualität und Umfang der vorhandenen Sequenzen ausgehen, als dies bei dem *de novo Assembly* des *Phelipanchetranskriptoms* zu erwarten ist. Je



### III Diskussion

öfter reads von *Phelipanche* den Sequenzen von *Arabidopsis* zugeordnet werden, desto wahrscheinlicher ist es, dass entsprechende Sequenzen im Transkriptom von *Phelipanche* gar nicht, nicht komplett oder zumindest fehlerhaft assembliert aufzufinden sind. Dies gilt insbesondere für Datensätze, die auf Entwicklungsstadien von *Phelipanche* beruhen, die bis zum Zeitpunkt der RNA-Isolation keinen Kontakt zur Wirtspflanze hatten. In einem solchen Fall ist nicht mit Kontaminationen durch die Wirtspflanze zu rechnen. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurden reads zumeist nur im geringen einstelligen Prozentbereich *Arabidopsis*sequenzen zugeordnet. Die Ausnahme stellte der Datensatz OrAe3G dar, dessen Sequenzen aus RNA von Keimlingen mit sich entwickelnden Haustorien gewonnen wurden. Hier kann, bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Wirt und Parasit in diesem Infektionsstadium, eine Kontamination durch die Wirts-RNA vermutet werden. Somit umfasste das assemblierte Transkriptom vermutlich einen Großteil der zu erwartenden Sequenzen von *P. aegyptiaca* und war damit für die Expressionsanalyse geeignet.

#### 1.4 Expression von Cysteinproteasen aus *P. aegyptiaca*

Die Expressionsanalyse zeigte in den ersten Entwicklungsstadien ein hohes Niveau von Transkripten der verschiedenen zu Cuscutain ähnlichen Cysteinproteasen. Beim ersten Kontakt mit *A. thaliana* ist ein sprunghafter Anstieg des Transkriptlevels zu beobachten. Die Expression verringert sich nach diesen Stadien wieder. Es scheint also, dass diese Cysteinproteasen in den Entwicklungsstadien zu Beginn der Infektion durch *P. aegyptiaca* eine wichtige Rolle spielen.

Im Gegensatz zu *Cuscuta*, wo die Umdifferenzierung von Sprossgewebe in ein Haustorium allein durch einen Kontaktreiz induziert wird, sind bei den Orobanchaceae biochemische Wechselwirkungen zwischen den Wurzeln des Wirts und der Keimwurzel des Parasiten ausschlaggebend. Orobanchaceae identifizieren die Wirtswurzel über Abbauprodukte von deren Zellwand. Im Speziellen werden pektinassoziierte, phenolische Substanzen der Wirtspflanze, wie z.B. Phenylpropanoide (Keyes et al. 2000), mittels vom Parasiten sezernierter Oxidoreduktasen (Veronesi et al. 2007) sowie Peroxidasen und Wasserstoffperoxid in Chinonderivate umgebaut. Das Redoxpotential dieser Derivate ist dann ausschlaggebend für ihre biologische Aktivität als Haustorium induzierender Faktor (Smith et al. 1996). Desweiteren exprimiert *Phelipanche* Polygalacturonasen (Veronesi et al. 2007), um die Pektine der Wirtspflanze abzubauen. Diese Vorgänge führen im Moment der Annäherung der Keimwurzel von Orobanchaceae an die Wurzel der Wirtspflanze zu einem positiven Feedback für die Haustorieninduktion.

### III Diskussion

Zur Abwehr von Pflanzenpathogenen werden in der Zellwand der Wirtspflanze Polygalacturonase inhibierende Enzyme (PGIP) (Ferrari et al. 2006) exprimiert. Diese stellen somit ein mögliches Ziel der Cysteinproteasen von *Phelipanche* dar, da nach deren Deaktivierung die Polygalacturonasen ungehindert arbeiten könnten. Gleichzeitig stellt sich allerdings die Frage, ob die Cysteinprotease auch die *phelipanche*eigenen Polygalacturonasen und Peroxidasen abbauen kann. In diesem Falle bräuchte es vermutlich Regulationsmechanismen, mit denen ein Abbau dieser parasitären Enzyme verhindert wird. Dennoch würde dies den vergleichsweise hohen Level der mRNA für Cysteinproteasen in den ersten Keimungsstadien erklären, da der Parasit direkt nach der Keimung auf der Suche nach einem Wirt ist. Aufschluss könnten hier verschiedene Experimente mit *Phelipanche* bringen: So könnte man einen Knockdown der Cysteinproteasen in *Phelipanche* herbeiführen oder Wirtspflanzen PGIPs in den Wurzeln überexprimieren lassen. Falls die Hypothese stimmt, sollten diese Veränderungen zu einer Verringerung der Infektionsrate führen.

#### 1.5 Effekt des PrePropeptids auf die Infektion durch *Cuscuta*

Die Expression des 35S-PrePropeptid-Konstruktes in *N. tabacum* ergab beim Versuch der Infektion mit *C. reflexa* widersprüchliche Ergebnisse. Gegenüber Wildtyppflanzen konnte zunächst eine deutliche Reduktion der Infektionen erzielt werden. Dieses Ergebnis entspricht allerdings nicht dem des zweiten Versuchs, bei dem sich keine signifikanten Unterschiede ergaben. Eine Erklärung für das abweichende Verhalten könnten die unterschiedlichen Jahreszeiten liefern, in denen die Versuche stattfanden. Während der Wintermonate ist es schwierig, *Cuscuta* in ihrem vegetativen Stadium am Leben zu erhalten, da *Cuscuta* üblicherweise im Herbst abstirbt. Es erwies sich als unmöglich, während des Winters auf dem beschriebenen Weg Tabakpflanzen zu infizieren. Der Zeitpunkt, zu dem der erste Versuch stattfand, stellte darum die erste Gelegenheit zur Durchführung des Versuchs dar. Es kann somit sein, dass die Effektivität des PrePropeptides von der Vitalität der *Cuscuta*pflanzen abhängig ist.

#### 1.6 Wirkung des PrePropeptids auf *Phelipanche*

Das *in vitro polybag*-System ermöglichte die durchgängige Beobachtung der Entwicklung in den Stadien zwischen Keimung und der Bildung erster *Phelipanche*prosse. Somit ließ sich der Einfluss des PrePropeptides auf die Keimung, die Anlagerung und Infektion der Wirtswurzel und das Wachstum der Tuberkel

### III Diskussion

bestimmen. Es wurden dabei gleichmäßige Keimungsraten der *Phelipanchesamen* in den verschiedenen Arealen der Polybags festgestellt. Diese änderte sich auch nicht bei Anwesenheit oder Fehlen von Wurzeln der Wirtspflanze in der Nähe der Samen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die natürliche Expression von Strigolactonen durch die Wurzeln der Wirtspflanze keine Rolle für das Keimungsverhalten spielte. Die Zugabe des Strigolacton-Analogons GR24 war somit hauptverantwortlich für die Induktion der Keimung. Die Expression des Propeptids in Tabak hatte ebenso auf das Keimungsverhalten der Parasitensamen keine Wirkung.

Es zeigte sich, dass die verwendeten Konstrukte zur Expression des Cysteinprotease Inhibitors aus *C. reflexa* Wirkung auf die Infektionsrate von *P. aegyptiaca* hatten. Die genaue Wirkungsweise und die Substratspektren von Cuscutain und seinem Inhibitor als auch seinem Analogon in Orobanche sind noch nicht bekannt. Eine Expressionsstudie über die Reaktion von *Lotus japonicus* auf eine Infektion mit *P. aegyptiaca* zeigte jedoch eine Hochregulierung von gleich mehreren Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Proteaseinhibitoren in *L. japonicus*. Darunter fand sich auch eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu einem Cysteinproteaseinhibitor (Hiraoka et al. 2009). Die Expression des Cysteinproteaseinhibitors konnte dabei erst zehn Tage nach der Infektion von *L. japonicus* mit bereits gekeimten *Phelipanchesamen* beobachtet werden. Betrachtet man im Verhältnis dazu die Expression von Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca*, ist das Maximum an Expression bereits zwischen 6 und 24 Stunden nach der Infektion zu sehen (Abb. 13). Somit scheint die Abwehrreaktion des Wirtes erst zu spät anzulaufen. Bei der Expression der Inhibitorstrukturen könnte es sich also um eine Unterstützung der pflanzlichen Abwehrreaktion auf den Angriff der parasitären Pflanze handeln. Dies bietet auch eine Erklärung für das weniger effektive Abwehrverhalten bei Verwendung des attAGP-Promotors. Dieser führt nicht wie der 35S-Promotor zu einer konstitutiven Expression des Propeptids, sondern wird zumeist erst mit der Infektion aktiviert.

Da nach einer erfolgten Infektion keine Unterschiede in Wachstumsgeschwindigkeit und Letalität der Parasiten feststellbar waren, kann eine Wirkung hauptsächlich für die ersten Infektionsstadien vermutet werden. Dies ist auch der Zeitpunkt, in denen die ermittelte Expression der zu Cuscutain ähnlichen Cysteinproteasen in *P. aegyptiaca* das höchste Niveau erreicht. Ob die Expression des PrePropeptids nur der Abwehr parasitärer Pflanzen dienlich ist, oder noch weitere Phytopathogene betrifft, kann zum momentanen Zeitpunkt nicht gesagt werden. In Frage kommen hier Insekten, beispielsweise Blattläuse, bei denen Cysteinproteasen im Verdauungsapparat gehemmt werden könnten (Murdock et al. 1987).

### III Diskussion

Die Infektionsraten konnten in den gezeigten Experimenten jeweils nur verringert werden, eine komplette Resistenz, wie sie z.B. in strigolactondefizienten Tomaten (Dor et al. 2010) erreicht werden konnte, wurde nicht erzielt. Hierbei sollte weiterhin beachtet werden, dass die Konzentration der Phelipanchesamen im Boden unter landwirtschaftlichen Bedingungen zwar nicht bekannt ist, aufgrund der vielen beobachteten Infektionen im Versuch aber vermutlich eine vergleichsweise hohe Konzentration zum Einsatz kam. Die Infektionsraten in Feldversuchen könnten dementsprechend unterschiedlich ausfallen.

## IV. Ausblick

Ob der attAGP-Promotor noch durch andere, als die gezeigten biotischen und abiotischen Faktoren induziert werden kann, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. So besteht die Möglichkeit, dass weitere Pflanzenpathogene, wie z.B. Pilze eine Wirkung haben. Ob Salicylsäure bei der Induktion des attAGP-Promotors während des Angriffs durch *Cuscuta* eine Rolle spielt, ließe sich durch Kreuzung der Tomaten mit dem Konstrukt aus attAGP-Promotor und GUS-Gen sowie Tomaten mit einem künstlich verminderten Gehalt an Salicylsäure (Gaffney et al. 1993) untersuchen. Solche Tomaten bauen mittels des Enzyms Salicylat-1-Monooxygenase Salicylsäure ab. Bei der Antwort der Pflanzen auf Befall mit Phytopathogenen kann dieses Hormon dann nicht mehr gebildet werden. Wenn sich zusätzlich mittels NPA der Auxintransport ausschalten lässt, sollte sich an der Infektionsstelle nun nach einer X-Gluc-Färbung keine Blaufärbung mehr beobachten lassen, wenn *Phelipanche* oder *Cuscuta* die Pflanze befallen.

Infizierte man attAGP-GUS-Tomaten unter NPA-Behandlung mit beiden Parasiten, so sollte sich bei *Phelipanche* keine Reaktion zeigen. Im Falle von *Cuscuta* sollte dagegen weiterhin eine Blaufärbung zu sehen sein, falls die gebildete Salicylsäure für eine Induktion ausreicht.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse liegt eine Kreuzreaktivität der beschriebenen Cysteinprotease-Inhibitoren aus *C. reflexa* und *P. aegyptiaca* nahe. Sicherheit über diese Vermutung ließe sich mittels eines Enzymassays gewinnen, in welchem man die Wirkung der beiden inhibitorischen Peptidsequenzen auf die Cysteinproteasen der jeweils anderen Pflanze bestimmt und vergleicht. Die Sequenz des Propeptides der Cysteinprotease aus *P. aegyptiaca* wurde daher im Zuge dieser Arbeit aus *Phelipanche* cDNA amplifiziert und mit einem n-terminalen Histidin-tag versehen in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert (Daten nicht gezeigt). Aus mit dem Vektor transformierten *E. coli* konnte das Propeptid jedoch noch nicht isoliert werden. Weiterhin wäre es von Interesse, das Substratspektrum beider Proteasen genauer zu untersuchen, was weiteren Aufschluss über die Wirkung geben könnte.

Um die Funktionsweise der Cysteinproteasen in *Phelipanche* und *Cuscuta* näher aufzuklären, sind detailliertere Informationen über die Lokalisation und den Zeitpunkt der Expression notwendig. Vorstellbar wäre, die Promotorsequenzen der Cysteinproteasen zu isolieren und in einer Fusion mit einem Reportergen in den parasitären Pflanzen zu exprimieren. Das Reportergen sollte dann an der Stelle in der parasitären Pflanze lokalisierbar sein, an dem der Promotor auch unter

#### IV Ausblick

natürlichen Umständen aktiv wird. Alternativ bietet sich eine *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (F.I.S.H.) mit einer spezifischen Sonde gegen die mRNA der Cysteinprotease an. Es wäre auch ein Knockdown von Cysteinproteasen z.B. mit Hilfe von RNAi-Konstrukten in den parasitären Pflanzen möglich. Daraus könnten sich Erkenntnisse über das Infektionsverhalten bei künstlich verringertem Gehalt der genannten Cysteinproteasen ergeben. Für *C. reflexa* und seit kurzem auch *P. aegyptiaca* sind für dieses Vorgehen benötigte Methoden zur Transformation und Regeneration mittels *in vitro*-Kultivierung beschrieben (Srivastava & Dwivedi 2001; Borsics et al. 2002; Mónica Fernández-Aparicio et al. 2011).

In den Ergebnissen deutet sich ein Effekt des attAGP-Promotors auf die Infektionsrate von *P. aegyptiaca* an, wenn dieser die Expression des PrePropeptids steuert. Jedoch scheint die Wirkung nicht auf dem Niveau des 35S-Promotors zu sein. Da weitere durch Phelipanche induzierbare Promotoren bekannt sind (Griffitts et al. 2004), würde es sich anbieten, diese mit dem PrePropeptid zu kombinieren. Hierbei erscheinen aufgrund der Resultate dieser Arbeit sowohl die durch den Promotor vermittelte Expressionsstärke als auch Zeitpunkt der Induktion in der Wirtspflanze in einem frühen Stadium der Infektion ausschlaggebend. Andererseits ließen sich auch schon bekannte und gegen *P. aegyptiaca* gerichtete Konstrukte mit dem attAGP-Promotor kombinieren. In Frage kommt beispielsweise das Gen für Sarcotoxin, welches toxisch auf *P. aegyptiaca* wirkt (Hamamouch et al. 2005) oder ein RNAi-Konstrukt, welches die mRNA der Mannose-6-Phosphatreduktase von *P. aegyptiaca* herunter reguliert (Aly et al. 2009).

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudie lassen sich sowohl weitere Gene als auch deren Expression während der betrachteten Entwicklungsstadien in *P. aegyptiaca* identifizieren. Dies kann nähere Hinweise über die während der Infektion beteiligten Gene und ihr Zusammenspiel liefern. Die in diesem Zusammenhang verwendete Methode verspricht Potential, wenn es darum geht, die Genexpression zweier oder auch mehr Organismen im parasitären oder symbiontischen Zusammenspiel zu ermitteln. Sobald ausreichende Transkriptom- oder Genomdaten der Organismen verfügbar sind, müssen diese dann nicht mehr vor einer Expressionsanalyse voneinander getrennt werden, sondern die Trennung geschieht erst nach der Sequenzierung durch Zuordnung der reads zur passenden Referenz.

## **V. Material und Methoden**

### **1.1 Arbeiten mit Pflanzen**

#### **1.1.1 *Nicotiana tabacum***

*N. tabacum* SNN wurde auf stickstoff- und phosphatarmer Erde, (P-Erde), ausgesät und bei 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit bei 22°C kultiviert. Nach ca. 2 Wochen wurden die jungen Pflanzen pikiert und in 3 Liter Töpfe umgesetzt. Diese enthielten für Versuche mit *Cuscuta* humusreiche, sog. LD80 Erde, für *Phelipanche* wieder P-Erde. Da die Produktion der für die Keimung von Wurzelparasiten wichtigen Strigolactone bei Phosphat- und Stickstoffmangel in Pflanzenwurzeln erhöht ist, wurde darauf geachtet, nicht mehr als für das Wachstum des Tabaks notwendig zu düngen.

Wurde der Tabak für das *in vitro polybag*-System verwendet, so erfolgte die Anzucht unter sterilen Bedingungen auf mit Phytoagar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) verfestigtem MS-Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland), das zusätzlich 3% Saccharose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthielt. Zunächst wurden hierfür die Tabaksamen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl 2% NaOCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min. oberflächensterilisiert. Die Samen wurden dann dreimal mit 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen, mit einer Pipettenspitze einzeln aufgesaugt und zu je fünf Samen in mit MS-Agar befüllte Magenta-Gefäße entlassen. Es wurde auf einen gleichmäßigen Abstand der Samen zueinander und den Wänden der Magentas geachtet, so dass ein größtenteils gleichmäßiges Wachstum der Tabakkeimlinge stattfinden konnte. Die Anzucht erfolgte bei 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit bei 22°C.

#### **1.1.2 *Cuscuta reflexa***

*C. reflexa* wurde auf *S. scutellarioides* als Wirtspflanze vegetativ unter gleichen Bedingungen wie *N. tabacum* in einem Gewächshaus vegetativ vermehrt. Das Wachstum konnte ab April auch unter normalen Tageslichtbedingungen stattfinden, im Winter wurde dringend künstliche Beleuchtung benötigt, um ein Absterben von *Cuscuta* zu vermeiden. Für Experimente wurden gesunde Sprosse von *Cuscuta* von der Kultur abgetrennt und um Pflanzstäbe gewickelt, wo sie eine Nacht verblieben. Dies geschah vorsichtig von unten nach oben gegen den Uhrzeigersinn und möglichst entlang der natürlichen Wuchsrichtung. Am nächsten Tag wurden die

## V Material und Methoden

Sprosse von den Pflanzstöcken abgenommen und um den Spross einer Tabakpflanze gewunden, was den Startzeitpunkt der Infektion markierte.

### 1.1.3 *Phelipanche aegyptiaca*

Samen von *P. aegyptiaca* waren freundlicherweise von Dr. Daniel Joel überlassen worden und stammten aus Bet Dagan, Israel (2005). P-Erde wurde mit 40-100 mg / l Phelipanchesamen versetzt und für eine gleichmäßige Verteilung gut durchmischt. Eine zwei bis drei Wochen alte Wirtspflanze (*N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*) wurde in einen Blumentopf gepflanzt, der mit 3 l der Erde befüllt war. Die Kultivierung geschah, wie für *N. tabacum* beschrieben. Erste Sprosse von Phelipanche zeigten sich 8-10 Wochen nach Pflanzung von *N. tabacum*.

### 1.1.4 *Solanum lycopersicum*

Tomaten (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) wurden unter den gleichen Bedingungen wie für Tabak beschrieben kultiviert.

### 1.1.5 In vitro polybag-System

Das System beruhte auf der Kultivierung von Pflanzen in flachen durchsichtigen Plastikbeuteln (Parker & N. Dixon 1983). Die Wurzeln der Pflanzen als auch die sich entwickelnden Parasiten können darin wiederholt und ohne physischen Eingriff beobachtet werden, indem man den Plastikbeutel mit den Pflanzen unter ein Stereomikroskop legt. Halt gibt dem Wurzelsystem als auch den Samen der Parasiten eine Lage Whatmanpapier (3MM).

Es wurden Vernichtungsbeutel aus Polypropylen verwendet, da diese autoklavierbar sind. In den Autoklavenbeutel wurde ein Whatmanpapier gelegt, das rechteckig so zugeschnitten war, dass es, in den Beutel gelegt, noch ca. 1-2 cm Platz zu den Rändern des Beutels hatte. Bei der Befüllung des Beutels mit 0,5x Hoagland Medium (pH 6,0) wurde das Medium am Rand herunterlaufen gelassen und so verhindert, dass eventuell die Samen der pflanzlichen Parasiten vom Medium weggespült wurden. Nach oben verblieben ca. 7 cm Platz. Dies ermöglichte es, den Beutel nach hinten umzuschlagen und so mit Tesafilm zu fixieren. In die gebildete Tasche kam dann ein Stab oder alternativ eine Glaspipette und den Beutel wurde auf diese Weise in einen Karton oder eine Kiste gehängt.



## V Material und Methoden

Das Hoagland Medium wurde mittels einer sterilen Pipette in ein kleines Loch an der Seite des Beutels eingefüllt. Das Loch wurde mittels einer Rasierklinge oder eines sterilisierten Skalpells in den Autoklavenbeutel geschnitten, mit einem Stück Tesafilm verschlossen und so zum Befüllen wiederverwendet. Es wurden dabei 15 - 30 ml Medium verwendet.

Nach dem Einfüllen des Hoagland Mediums wurden die Wirtspflanzen aus dem MS-Medium in die Plastikbeutel transferiert, wobei darauf geachtet wurde, möglichst geringe Beschädigungen an der jungen Pflanze zu hinterlassen, als auch möglichst wenig Agar mit in das Polybag zu transferieren. Die Wirtspflanzen wurden dann zwei Tage im Polybag belassen, um ein Anwachsen zu ermöglichen.

Dann wurden die Samen der Wurzelparasiten oberflächensterilisiert und für den Versuch verwendet. Im Falle von *P. aegyptiaca* wurden die Samen 10 Minuten in einer 2%igen Natriumhypochlorid Lösung mit 0,1% TritonX-100 unter ständigem vortexen sterilisiert und dann 3 x mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen.

Der Tesafilmstreifen, welcher die Wirtspflanzen fixierte, wurde vorsichtig so weit abgezogen, dass man die Plastiktüte mit Zeigefinger und Daumen aufwölben konnte. Mit der anderen Hand konnten nun die Parasitensamen in das Polybag gestreut werden. *P. aegyptiaca* wurde zunächst 10 Tage (Konditionierungsphase) auf diese Weise im Polybag inkubiert. Dann wurde die Keimung mit 2 ppm GR24 (erhalten von Binne Zwanenburg, Radboud University, Nijmegen) induziert. Ab diesem Zeitpunkt konnte die Keimung des Parasiten als auch der Befall des Wurzelsystems der Wirtspflanze beobachtet werden.

1x Hoagland's Solution (Plant Nutrient Solution):

Makroelemente:

Stockkonzentration	Bestandteil	ml/l (1x)	Endkonzentration
1 M	KNO <sub>3</sub> Kaliumnitrat	5 ml	0,005 M
1 M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Calciumnitrat	5 ml	0,005 M
1 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Kaliumdihydrogenphosphat	1 ml	0,001 M
1 M	MgSO <sub>4</sub> Magnesiumsulfat	2 ml	0,002 M
0,01 M	FeEDTA	10 ml	0,1 mM

## V Material und Methoden

### Mikroelemente (1 ml /l)

Stock Konzentration	Bestandteil	Endkonzentration
0,046 M	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Borsäure	2,86 g/l
0,009 M	MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O Manganchlorid	1,81 g/l
7,65 x 10 <sup>-4</sup> M	ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O Zinksulfat	0,22 g/l
3,2x10 <sup>-4</sup> M	CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O Kupfersulfat	0,08 g/l
1,11x10 <sup>-4</sup> M	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O Molybdänsäure	0,02 g/l

### 1.1.6 Applikation von Faktoren zur Induktion des attAGP-Promotors

Die Methodik, Phytohormone, insbesondere Auxine über eine Gelmatrix zu applizieren ist sehr alt (Boysen-Jensen 1913; Went 1928). Transgene Tomatenpflanzen die das Konstrukt aus attAGP-Promotor und GUS-Reportergen enthielten wurden mittels 2% NaOCl für 5 min oberflächensterilisiert und danach 3x mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Samen wurden auf 1x MS-Medium + 300 mg / l Kanamycin gelegt und für 1-2 Tage im Dunkeln keimen gelassen. Nachdem die beiden Keimblätter sichtbar waren (ca. 7 bis 10 Tage nach Ausplattieren der Samen) wurden die Keimlinge auf Agar mit 1x MS-Salzen umgesetzt. Saccharose wurde vor dem Autoklavieren zum Medium hinzugefügt. Die weiteren auf Induktionsfähigkeit des Promotors zu testenden Substanzen wie NAA, 2,4-D, ABA, SA, Mazerozym und Hefeextrakt wurden sterilfiltriert später zugesetzt. Die Petrischalen wurden mit Beginn der Kultur aufrecht gestellt, damit die Wurzeln der Tomaten nicht in den Agar einwuchsen. Die Keimlinge verblieben für 7 Tage auf den Medien und wurden dann entnommen um mittels X-Gluc-Lösung gefärbt zu werden.

## 1.2 X-Gluc-Färbung

Die zu färbenden Pflanzenteile wurden über Nacht in der X-Gluc-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch Leitungswasser ersetzt und das Präparat unter dem Mikroskop betrachtet. Eine zusätzliche Entfärbung chlorophyllhaltiger Gewebeteile konnte mittels Inkubation mit 70% Ethanol bei 37°C erreicht werden. Das Ethanol wurde dabei über einige Stunden hinweg mehrfach gewechselt.

### X-Gluc-Färbelösung

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
NaEDTA	10 mM
K-Ferricyanid	0,5 mM
K-Ferrocyanid	0,5 mM
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure (X-Gluc)	2 mM

## V Material und Methoden

Die Färbelösung konnte ohne das X-Gluc für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. In DMSO gelöstes 200 mM X-Gluc wurde dann vor den Experimenten frisch hinzugefügt.

### 1.3 Arbeiten mit Bakterien

#### 1.3.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

*E. coli* wurde bei 37°C in Rundkolben oder Reagenzgläsern auf Schüttlern bei 175 rpm in LB-Medium (Bertani 1951) kultiviert, das die jeweiligen Selektionsantibiotika für das entsprechende Plasmid enthielt. Es wurde der Stamm DH5-alpha verwendet.

#### 1.3.2 Transformation von *E. coli* mittels Heat shock

Bei der Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* wurde wie folgt vorgegangen (Sambrook & Russell 2000):

3 ml LB Medium wurden mittels eines sterilen Zahnstochers mit einer *E. coli* Kryokultur angeimpft. Mit 1 ml der über Nacht gewachsenen Vorkultur wurden am nächsten Tag 50 ml LB-Medium angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> im Schüttler kultiviert und dann für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Es erfolgte eine Zentrifugation (2504 x g, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dann in 3 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> +15% Glycerol aufgenommen und in 250 µl Aliquots für Transformationen verwendet oder zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Bakterien-Aliquot auf Eis zusammen mit den zu transformierenden Plasmiden für eine halbe Stunde inkubiert. Dann erfolgte für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und sofortige Zugabe von SOC Medium. Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agar Platten ausgestrichen, welche die entsprechenden Selektionsantibiotika für auf den Plasmiden vorhandene Resistenzen enthielten und über Nacht inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation zeigten sich am nächsten Tag Kolonien.

## V Material und Methoden

### SOC-Medium

Hefeextrakt	5 g /l
Bacto-Trypton	20 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM
pH 7,0	

### 1.3.3 Arbeiten mit *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* wurde bei 28-30°C im Schüttler bei 175 rpm in LB-Medium, das die entsprechenden Selektionsantibiotika enthielt, kultiviert. Verwendet wurde der Stamm GV3101 mit dem Helferplasmid pmp90.

### 1.3.4 Transformation von *A. tumefaciens* mittels freeze thaw Methode

Die Methode wurde adaptiert nach Höfgen und Willmitzer (Hofgen & Willmitzer 1988) durchgeführt. 1 ml einer Übernachtskultur von *A. tumefaciens* wurde in 50 ml frisches LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 - 1 kultiviert. Die Zellen wurden dann auf Eis herunter gekühlt und zentrifugiert (2504 x g, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde dann in eiskalter steriler 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und zu je 100 µl in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden frisch für eine Transformation verwendet oder in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Transformation fand durch die Zugabe von 1 µg DNA (in 10µl H<sub>2</sub>O) sowie anschließend Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> und darauffolgendem Auftauen im Wasserbad (37°C, 5 min) statt. Dann wurde sofort 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugefügt und die Zellen wurden 2-4 Stunden bei 28 °C geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden dann auf LB-Agar Medium, das die für die Selektion der transformierten binären Plasmide und die Helferplasmide entsprechenden Antibiotika enthielt, ausgestrichen und für zwei Tage kultiviert.

### 1.3.5 Kryokonservierung von Bakterien

Für längere Lagerung wurden die verwendeten Bakterien in einer Übernachtskultur in LB-Medium, das die entsprechenden Selektionsantibiotika enthielt vermehrt. Die

## V Material und Methoden

Bakteriensuspensionen wurden dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im Volumenverhältnis 7 : 3 mit 86% Glycerol überschichtet und kurz zur Durchmischung auf dem Vortex geschüttelt. Die Reaktionsgefäße mit den Bakteriensuspensionen wurden dann in flüssigen Stickstoff getaucht und nach ca. einer Minute entnommen und bei -80°C gelagert. Mittels steriler Zahnstocher oder Impföse konnten auf diese Weise flüssige oder feste Bakterienmedien erneut mit den konservierten Kulturen angeimpft werden.

### 1.3.6 Transformation von Tabak mittels *A. tumefaciens*

Transgene *N. tabacum* wurden mittels Blattscheibentransformation (Horsch et al. 1985) hergestellt. 1 ml einer Übernachtskultur von Agrobakterien wurde in 50 ml 2YT Medium überführt und für einen Tag im Schüttler kultiviert. Es wurde Acetosyringon (200 µM) zur Kultur gegeben und für weitere 2 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde danach entnommen und mit 2YT-Medium ohne Antibiotika auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt.

Blätter von ca. einem Monat alten Tabakpflanzen wurden mittels eines Skalpells in ca. 1 cm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten und durch Schwenken in 2% NaOCl Lösung für 5 Minuten an den Oberflächen sterilisiert. Danach folgten vier Waschschrte in je 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O. Die Blattscheiben wurden nun für 5 Minuten in der Agrobakteriensuspension kultiviert und dann kurz auf Filterpapier getrocknet. Es folgte ein Transfer der Blattscheiben auf Cokultivierungsmedium, das bereits die zu Kallusinduktion benötigten Phytohormone enthält, jedoch keine Antibiotika.

Nach zwei Tagen wurden die Blattscheiben dann auf Selektionsplatten transferiert, die zusätzlich zu den Phytohormonen 50 µg Hygromycin / ml für die Selektion transformierter Pflanzenzellen und 250 µg Carbenicillin / ml zum Abtöten der Agrobakterien enthielten. Sobald sich an den Rändern der Blattscheiben Kallus gebildet hatte, wurde dieser unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell abgetrennt und auf neuen Selektionsplatten weiter kultiviert. Die nach einer Zeit auf diesem Kallus entstehenden Sprosse wurden mit einem Skalpell abgetrennt, von restlichem Kallus gesäubert und in Selektionsmedium ohne Phytohormone gesteckt, das sich in Magenta Gefäßen befand. Sobald die Sprosse Wurzeln gebildet hatten, wurden sie aus dem Magenta entnommen und in Erde weiter kultiviert. Um einen zu starken Stress auf die Pflanzen durch zeitgleiche Änderung von Substrat und Luftfeuchtigkeit zu vermeiden, erhielten diese während der ersten Tage nach dem Eintopfen lichtdurchlässige Abdeckungen, z.B. Bechergläser oder Petrischalen.

## V Material und Methoden

### Co-Kultivierungsmedium:

1 x MS (Murashige & Skoog 1962) Mikro- und Makroelemente	
Saccharose	3%
Pflanzenagar	0,8 %
pH 5,8 (KOH)	

nach dem Autoklavieren wurden hinzugefügt:

6-Benzylaminopurin (BAP)	1 mg / l
Naphthylelessigsäure (NAA)	0,1 mg / l

Für die Selektion wurden hinzugefügt:

Carbenicillin	250 mg/l
Hygromycin B	50 mg/l

### 2YT-Medium

Hefeextrakt	10 g
Bacto-Trypton	16 g
NaCl	5 g

### LB-Medium

Hefeextrakt	5 g
Bacto-Trypton	10 g
NaCl	5 g

## 1.4 Molekularbiologische Methoden

### 1.4.1 Isolation von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Blatt oder Spross der Pflanze wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert, bis ein feines Pulver entstanden war. Ca. 100 mg des Pulvers wurden zu 750 µl DNA-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform gegeben und auf dem Vortex gemischt. Die Proben wurden sodann bei 65°C für 30 min inkubiert und hernach bei 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit Isopropanol versetzt, gevortext und dann bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml 70% Ethanol, eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge und das gründliche Abnehmen des Überstandes. Das Präzipitat wurde in 300 µl H<sub>2</sub>O

## V Material und Methoden

gelöst. Es wurden 6 µl RNase A (100 mg / ml) hinzugefügt und 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. 3M NaAc sowie Inkubation ÜN bei -20°C wurde die DNA gefällt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge und ein weiterer Waschschrift mit eiskaltem 70% Ethanol. Das Präzipitat wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 5 min bei 37°C inkubiert. Eine Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

### DNA-Extraktionspuffer

Sarcosyl	1 %
NaCl	0,8 M
EDTA	0,022 M
Tris/HCl pH 7,8	0,22 M
CTAB	0,8 %
Mannitol (oder Sorbitol)	0,14 M

Vor Gebrauch wurden 14 µl 2-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer frisch zugeben.

#### 1.4.2 Plasmidisolation aus *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Isolation von Plasmid-DNA basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979; Birnboim 1983). Bei dieser Methode wurde die Zellwand durch EDTA in Puffer P1 destabilisiert und durch SDS im sehr alkalischen Puffer P2 vollständig lysiert. Zudem wurden durch Puffer P2 Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturiert. Letztere renaturierte wenn durch Zugabe von Puffer P3 der pH-Wert neutralisiert wurde, so dass sich nach der anschließenden Zentrifugation vor allem die gewünschte Plasmid-DNA im Überstand befand, welche dann durch Isopropanol gefällt wurde. Die genaue Vorgehensweise ist im Folgenden beschrieben:

1-1,5 ml einer ÜN-Kultur (Gesamtvolumen 3 ml) wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sec. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 300 µl kaltem Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert.

Zu der Suspension wurden 300 µl Puffer P2 gegeben, bevor zum Mischen einige Male vorsichtig invertiert und dann für maximal 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Danach wurden 300 µl kalter Puffer P3 zugegeben, durch Schütteln gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und dann 15 min zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurden 800 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und wiederum für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl des Überstandes abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 800 µl Isopropanol versetzt, invertiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 15 min

## V Material und Methoden

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde 2 x gewaschen. Hierzu wurden 500 µl kaltes 70% Ethanol zugegeben, 5 min zentrifugiert und der Alkohol vorsichtig wieder abgenommen. Abschließend wurde das Präzipitat für 10 min bei 37°C getrocknet, dann in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Plasmid-DNA zwecks Abschätzung von Ausbeute und Verunreinigung durch Proteine, Zucker und phenolische Komponenten photometrisch bei 230, 260 und 280 nm vermessen.

### **Puffer P1** (Resuspensionspuffer):

Tris/HCl, pH 8	50 mM
EDTA	10 mM

### **Puffer P2** (Lysis-puffer):

NaOH	200 mM
SDS	1%

### **Puffer P3** (Neutralisationspuffer):

Kaliuacetat; pH 5,5 mit Essigsäure	3M
------------------------------------	----

Puffer P1 wurde autoklaviert, nach dem Abkühlen mit 100 µg / ml RNaseA versetzt und bei 4°C gelagert.

Lagerung von Puffer P2 bei RT.

Puffer P3 wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

### 1.4.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten oder die Aufreinigung von mit Digoxigenin markierten Sonden wurden diese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Bereiche des Gels, welche die betreffenden Banden enthielten, wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA mittels des Kits NucleoSpin ExtractII der Fa. Macherey Nagel aus dem Gel extrahiert. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

### 1.4.4 PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit Polymerasen verschiedener Hersteller (MBI Fermentas; Biotherm) durchgeführt. Es wurde üblicherweise unter 50 ng Template DNA eingesetzt. Primer (Operon, IDT) wurden mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) berechnet und die erste PCR 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur ( $T_m$ ) durchgeführt. Im Falle von Amplifikationen aus cDNA



## V Material und Methoden

wurde zusätzlich ein Temperaturgradient angelegt, indem die Annealingtemperatur für die einzelnen Proben in 1°C-Schritten von der Starttemperatur aus erhöht wurde.

Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
<b>2. Denaturierung</b>	<b>95 °C</b>	<b>20 sek</b>
<b>3. Primer-Anlagerung</b>	<b>T<sub>m</sub> -5 °C</b>	<b>20 sek</b>
<b>4. Elongation</b>	<b>72 °C</b>	<b>1 min pro 1 kB</b>
5. Finale Elongation	72 °C	10 min

Fett unterlegt ist der zyklische Bereich der PCR. Die Anzahl der Zyklen schwankte je nach Versuch zwischen 26 und 30 Zyklen.

### 1.4.5 Restriktionsabbau

Der Restriktionsabbau von DNA-Fragmenten und Plasmidvektoren wurde mit den Enzymen verschiedener Hersteller durchgeführt (NEB, MBI Fermentas). Dabei wurde nach den Vorgaben der jeweiligen Hersteller gearbeitet. Eine Aufreinigung für Klonierungen erfolgte nach eventueller Hitzedeaktivierung der Enzyme mittels Phenol-Chloroform Extraktion (Sambrook & Russell 2000) oder mittels des NucleoSpin Extraction Kits (Macherey Nagel). Die gewonnenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

### 1.4.6 Ligation von Fragmenten in Plasmidvektoren

Für die Ligation der per PCR mit passenden Schnittstellen für die jeweiligen Vektoren versehenen DNA-Fragmente wurden verschiedene molare Verhältnisse von Vektor zu Insert (X) verwendet. 1:3, 1:5 und 1:10. Ein Ligationsansatz von 20 µl sah demnach wie folgt aus:

Vektor-DNA	100 ng
DNA-Fragment	X ng
10x T4 Ligase Puffer (Enthält ATP!)	2 µl
T4 DNA-Ligase	2 U
H <sub>2</sub> O	X µl
Gesamt:	20 µl

Der Ligationsansatz wurde vorsichtig mit einer Mikropipette gemischt und dann entweder bei RT für eine Stunde oder bei 16°C ÜN inkubiert. Anschließend wurde er

## V Material und Methoden

für die Transformation von *E. coli* verwendet. Es wurden ausschließlich gerichtete Klonierungen durchgeführt. D.h. Vektor und Insert wurden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, die sog. *sticky ends* erzeugen, geschnitten. Aufgeschnittener Vektor mit und ohne Ligase sowie reines H<sub>2</sub>O dienten als Negativkontrolle und wurden ebenfalls in *E. coli* transformiert, um den Hintergrund durch einfach geschnittenen und religierten Vektor oder gar nicht geschnittenes Plasmid abzuschätzen. Als Test für den Ligase und Ligationspuffer wurde das geschnittene PCR-Fragment mit sich selber ligiert und mittels Gel-Elektrophorese als Bandenmuster der verschiedenen Multimere des Fragments sichtbar gemacht. Nach Transformation des Ligationsansatzes wurde mit den auf Selektionsmedien gewachsenen Bakterienkolonien eine Plasmidisolation durchgeführt und die Plasmide sowohl mittels PCR gegen das Insert als auch mittels Restriktionsanalyse überprüft.

### 1.4.7 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmidvektoren wurden durch die Fa. Seqlab durchgeführt.

## 1.5 RNA

### 1.5.1 Gesamt-RNA Isolation

Die Methode zur RNA-Isolation nach Wilkins und Smart (Wilkins & Smart 1996) wurde mit leichten Modifikationen angewendet. 300 mg unter Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 0,8 ml Lysispuffer gegeben und unter warmem Wasser und intensivem Vortexen auftauen gelassen. Es wurden 0,8 ml PCI hinzugefügt und zwischen 30 min. und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 15 min bei 10000 g zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen (600 – 800 µl) und mit 0,75 Vol. 8 M LiCl versetzt. Die RNA wurde für eine Stunde bei 4°C gefällt. Es wurde erneut mit 10000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst. 30 µl KAc wurden hinzugefügt sowie 750 µl EtOH. Die Proben wurden dann für mindestens 30 min bei -80°C inkubiert. Die RNA wurde mit einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 g sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol überschichtet. Nach Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Eppendorfgefäß mit offenem Deckel für 10 min auf Eis gestellt. Es wurden 50 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt und das Pellet darin resuspendiert.

## V Material und Methoden

Lösungen:

Alle wässrigen Lösungen wurden mit DEPC (0,1%) versetzt, mindestens 1 h stehen gelassen und dann autoklaviert.

### Lysis-Puffer (100 ml)

NaCl	0,6 M
Tris/HCl, pH 8	0,1 M
EDTA	0,01 M
SDS	4%

PCI

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol  
Mischungsverhältnis 25 : 24 : 1

3 M NaAc oder KAc, pH 5

ddH<sub>2</sub>O

70 % EtOH

100 ml → 70 ml 96% EtOH + 30 ml autoklaviertes  
DEPC-dH<sub>2</sub>O

96 % EtOH (ohne DEPC)

Konzentrationsbestimmung:

Die OD einer 1:50 Verdünnung wurde bei 260, 280 und 230 nm am Photometer vermessen →  $OD_{260} = 1$  entspricht 40 µg RNA / ml (dabei sollte das Verhältnis von 260/280 ca. 1,6-2 betragen und das von 260/230 sollte bei 2,5-3 liegen)

### 1.5.2 Auftrennung von RNA im MEN-Agarosegel

Die Überprüfung der photometrischen Konzentrationsbestimmung und der Northern Blot erforderten die Auftrennung der RNA in einem denaturierenden MEN Agarosegel. Es wurden zwischen 500 ng und 2 µg RNA verwendet. Um Sekundärstrukturen aufzulösen wurde diese zunächst mit RNA-Ladepuffer und H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl gebracht und dann bei 65°C für 10 min denaturiert. Es erfolgte ein promptes Abkühlen der RNA für 2 min auf Eis, um ein Renaturieren der RNA zu verringern. Die Proben wurden dann auf das Gel

## V Material und Methoden

aufgetragen und bei 50 V in 1 x MEN Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mittels einer Geldokumentationsanlage fotografiert.

### RNA-Ladepuffer:

Formamid	0,72 ml
MEN-Puffer (10 x)	0,16 ml
Formaldehyd (37 %)	0,26 ml
Glycerin (80 %)	0,10 ml
H <sub>2</sub> O	0,18 ml
Bromphenolblau (2 %)	0,08 ml
Ethidiumbromid-Lösung (1 %)	3 µl

### MEN-Puffer (10 x):

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	0,2 M
EDTA	0,01 M
Natriumacetat-Trihydrat	0,05 M

### MEN-Agarosegel:

Agarose	0,5 g
H <sub>2</sub> O	42,5 ml
Aufkochen und nach Abkühlung auf ca. 50 – 60 °C zugegeben:	
MEN (10 x)	5 ml
Formaldehyd (37 %)	2,7 ml

## 1.5.3 Northern Blot

### Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Das Bloten der RNA auf eine Nylonmembran (Applichem, Darmstadt) erfolgte über Kapillartransfer. Dafür wurde die Membran in der Größe des RNA-Gels ausgeschnitten und in 1x SSC-Puffer getaucht. Die Membran wurde dann auf zwei übereinander liegende Whatman Papiere gelegt und diese wiederum auf einen ca. 15 cm hohen Stapel saugfähigen Papiers. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Mittels eines längeren Streifens Whatman Papier, der über das Gel gelegt wurde und der mit seinen Enden in Transferpuffer lag erfolgte über Nacht der Nachschub von Puffer. Am nächsten Tag wurde die Membran entnommen und ein *crosslinking* mit 0,12 J UV-Licht durchgeführt (UV Stratalinker 2400, Stratagene).

## V Material und Methoden

### SSC-Puffer (10x):

Na 3-Citrat; pH 7,0	0,15 M
NaCl	1,5 M

### Sondenherstellung mittels Dig-UTP

Für den Einbau von Digoxigenin markierten Nukleotiden in PCR-Reaktionen wurde nach den Vorgaben der Fa. Roche vorgegangen. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Einsatz von chemisch an Digoxigenin gekoppelter UTPs, die in einer PCR von einer DNA-Polymerase in die zu synthetisierenden Stränge eingebaut werden können. Das PCR-Produkt dient dann als Sonde für homologe RNA-Sequenzen auf der Membran. Zusätzlich wurde eine PCR-Reaktion unter gleichen Bedingungen aber ohne Dig-UTPs sondern nur mit unmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Dies ermöglicht eine Überprüfung des Einbaus in das PCR-Produkt, da bei gleicher Sequenz ein Einbau der Dig-UTPs zu einer langsameren Bewegung im Agarosegel führt. Die Bande der Digoxigenin markierten Sonde wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels eines QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (Vorgehen nach Qiagen QIAquick-Protokoll).

### Hybridisierung der Nylonmembran mit einer Digoxigenin markierter Sonde

Die Membranen mit der fixierten RNA wurden in 2x SSC Puffer + 0,5% SDS gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte in einem 50 ml Falcon Röhrchen, in das die Membran mit der Oberseite nach innen weisend hineingeschoben wurde. Unter Drehen des Röhrchens in einem Hybridisierungssofen bei 42°C wurde für 2 h eine Prähybridisierung der Membran mit 10 ml *DIG easy hyb* (Roche) durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde die Sonde zu 100 µl *DIG easy hyb* Lösung gegeben und bei 95°C und 10 min denaturiert. Es erfolgte für 2 min eine Inkubation auf Eis. Die Sonde wurde dann zu 10 ml *DIG easy hyb* Lösung gegeben (Endkonzentration: 20 ng DNA / ml) und die Membran über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C und eingeschaltetem Rotor inkubiert. Die Membranen wurden dann in einem Wasserbad in Waschpuffer geschüttelt. 2x 15 min 2x SSC/0,1% SDS bei RT und bei stringenteren Bedingungen, nämlich 2x 15 min 0,5x SSC/0,1% SDS bei 62°C.

## V Material und Methoden

Dig-Waschpuffer:

Maleinsäure, pH 7,5	0,1 M
NaCl	0,15 M
Tween (frisch zugeben)	0,3 %

### Detektion mittels Antikörper gegen Digoxigenin

Die Membran wurde in DIG-Waschpuffer bei RT für 5 min äquilibriert. Es erfolgte eine Inkubation der Membran mit 10 ml Blocking Puffer für 1 h bei RT. Es wurde dann 1 µl des DIG-Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist (Roche), mit 10 ml Blocking Puffer versetzt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation mit DIG-Waschpuffer 2x 15 min bei RT auf einem Schüttler. Die Membran wurde in DIG-Detektionspuffer für 5 min inkubiert. Zur Detektion wurde ein Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugefügt, CDP-Star (Amersham). Das CDP-Star wurde 1:50 in Detektionspuffer verdünnt und mittels einer Pipette auf die Membran aufgebracht. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die alkalische Phosphatase setzt CDP-Star unter Freisetzung von Licht um, welches durch eine Kamera in einer sog. Chemidoc (BioRad) detektiert wurde.

### Blocking Puffer:

Dig-Waschpuffer + 5% Magermilchpulver

### Dig-Detektionspuffer:

Tris-HCl; pH 9,5	0,1 M
NaCl	0,1 M

## 1.6 Bioinformatische Methoden

Für die Durchführung der verschiedenen Schritte kamen zwei herkömmliche x86-Personalcomputer mit 64 Bit CPUs sowie mit 3 und 4 GB RAM und SWAP-Partitionen zwischen 14 und 40 GB zum Einsatz. Betriebssystem war auf beiden Computern ein Ubuntu-Linux 11.04-64.

### 1.6.1 Assembly eines Transkriptoms von *P. aegyptiaca*

Da bis zum Zeitpunkt der Arbeit kein Genom für Orobanchaceae zur Verfügung stand, wurde ein Transkriptom aus verfügbaren cDNA Sequenzen assembliert. Das

## V Material und Methoden

*Parasitic Plant Genome Project* (PPGP; <http://ppgp.huck.psu.edu/>) bietet zwar bereits Assemblies, welche einem Transkriptom nahe kommen sowie die dazu gehörigen Rohdaten an. Diese enthalten allerdings Kontaminationen der Wirtspflanzen *A. thaliana* und *N. tabacum* (Jim Westwood, persönliche Kommunikation). Bei einem Sequenzabgleich auf DNA-Ebene mittels blastn in diesen vorhandenen Assemblies wurden daher nicht nur Phelipanchetranskripte gefunden, sondern auch die der jeweiligen Wirtspflanzen. Aus diesem Grunde wurde mittels des Programms *Trinity* (Grabherr et al. 2011) ein neues Transkriptom assembliert.

Die dafür verwendeten Sequenzierungsdaten (OrAe1F u. OrAe2F; Roche 454 Sequenzierung) vom PPGP beziehen sich auf Entwicklungsstadien, in denen der Parasit noch keine direkte Verbindung über ein Haustorium mit dem Wirt hatte. Zum einen handelte es sich um Samen, in denen die Keimung induziert wurde, des weiteren um Keimlinge, die für 6-24 Stunden in Kontakt mit Arabidopsiswurzeln gebracht wurden, bevor sie wieder von der Wirtspflanze herunter gewaschen wurden. Die beiden Sequenzdateien wurden für das Assemblieren in einer einzigen fasta-Datei zusammengefasst, in denen sich dann einige hunderttausend Sequenzen, sogenannte *reads* befanden. Der Prozess des Assemblierens benötigte ca. 12 Stunden und resultierte in einer fasta-Datei mit 38408 sogenannten contigs. Dabei handelt es sich um aus einzelnen reads zusammengestzte Fragmente, welche im optimalen Fall jeweils ein gesamtes Transkript ergeben. Mittels tblastn wurde diese Transkriptombank auf zu Cuscutain ähnliche Sequenzen abgesucht und die 20 wahrscheinlichsten Suchergebnisse später analysiert. Die übrigen contigs der Bank wurden ebenfalls mittels blastn gegen die nicht redundante Nukleotiddatenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Arabidopsis hin untersucht. BLAST-Ergebnisse, die eine Fehlerwahrscheinlichkeit für Verwandtschaft mit *A. thaliana*  $< e^{-60}$  aufwiesen, wurden genauer betrachtet. Es konnten dabei 18 contigs identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich auf RNA aus Arabidopsis zurückzuführen sind. Diese wurden dann später aus dem Alignment entfernt und flossen nicht in die Berechnungen für die Expressionslevel ein.

### 1.6.2 Alignment der Sequenzdaten

Die Rohdaten von verschiedenen Entwicklungsstadien von *P. aegyptiaca* wurden von der Internetseite des PPGP heruntergeladen und ein Alignment, d.h. eine Zuordnung der enthaltenen reads, mit den Sequenzen des assemblierten Transkriptoms von *P. aegyptiaca* sowie einer cDNA-Bank von *A. thaliana* durchgeführt.

## V Material und Methoden

Die Überprüfung der Illumina-Rohdaten geschah mit dem Programm FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>), das eine grafische Übersicht über verschiedene, die Qualität der Daten betreffende statistische Parameter bietet. Es lassen sich damit z.B. die durchschnittlichen Wahrscheinlichkeiten für eine fehlerfreie Sequenzierung von Beginn bis Ende der Sequenzen ermitteln. Weiterhin bietet es die Möglichkeit, Kontaminationen der Daten durch Artefakte wie z.B. Adaptersequenzen oder Sequenzierungsprimer zu ermitteln. Zusätzlich wurde die FastX Programmsammlung ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) verwendet, welche eine basenpaargenaue Abbildung der vom Illumina-Sequenzierer ermittelten Qualität und der Verteilung des Gehaltes der verschiedenen Basen ermöglicht.

### 1.6.3 Verarbeitung der Rohdaten

Für die folgenden Schritte wurde nach dem Ermitteln geeigneter Parameter ein Shellskript geschrieben, um eine automatisierte Stapelverarbeitung ohne Aufsicht zu ermöglichen.

Das Filtern der Rohdaten geschah mit der Programmsammlung FastX und umfasste das Abschneiden von allgemein qualitativ ungenügenden Sequenzbereichen am Anfang und am Ende der Rohdaten, das Filtern von weiteren Artefakten im gesamten Sequenzbereich und das Aussortieren von auch im Mittelteil ihrer Sequenz qualitativ unterdurchschnittlichen reads. Der Filter ließ dabei nur reads passieren, die zu  $\geq 90\%$  aus Basenpaaren bestanden, für die eine Wahrscheinlichkeit von  $\leq 0,01$  für einen Sequenzierfehler bestand. Sequenzen, die überdurchschnittlich oft vorhanden waren, wurden zunächst auf biologische Relevanz hin untersucht. rRNAs, Adaptersequenzen oder PCR-Primer und andere Artefakte wurden mit den Programmen cutadapt (Martin 2011) (<http://code.google.com/p/cutadapt/>) und fastx\_artifacts\_filter zusammen mit dem Rest des reads aus den Datensätzen entfernt. Bei den Illumina-Datensätzen handelte es sich um sog. paired end reads, d.h. bei den Sequenzierungen wurde jeweils von beiden Seiten in die einzelnen cDNA-Fragmente hineingelesen. Die Daten der beiden Fragmentenden lagen dabei pro Datensatz in zwei fastq-Dateien vor. Da einige der verwendeten Programme nur ungenügend für nachfolgende Schritte mit zwei Einzeldateien umgehen können, wurden diese mit Hilfe von zwei Python Skripten aus dem galaxy toolset (Blankenberg et al. 2010) zunächst zu einer Datei vereinigt, verarbeitet und dann für das Alignment an die Referenz wieder getrennt.

Das Alignment wurde mit dem Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt.





## V Material und Methoden

```
python fastq_pair_end_splitter.py joinedclip.fastq illumina qualtrim1.fastq qualtrim2.fastq

./fastx_quality_stats -i qualtrim1.fastq -o qualtrim1.txt &
./fastx_quality_stats -i qualtrim2.fastq -o qualtrim2.txt &
wait
./fastx_quality_boxplot_graph.sh -i qualtrim1.txt -o qualtrim1Quality.png -t "Quality score"
./fastx_quality_boxplot_graph.sh -i qualtrim2.txt -o qualtrim2Quality.png -t "Quality score"
./fastx_nucleotide_distribution_graph.sh -i qualtrim1.txt -o qualtrim1NucDistribution2.png -t "Nucleotide
distribution"
./fastx_nucleotide_distribution_graph.sh -i qualtrim2.txt -o qualtrim2NucDistribution2.png -t "Nucleotide
distribution"

# Vorverarbeitung beendet - Output: Vorverarbeitete qualitätsgefilterte Dateien; Qualitätsstatistik vorher und
nachher

# Alignment

bwa index -a is reference.fasta
bwa aln reference.fasta qualtrim1.fastq > out1.sai &
bwa aln reference.fasta qualtrim2.fastq > out2.sai &
wait
bwa sampe reference.fasta out1.sai out2.sai qualtrim1.fastq qualtrim2.fastq > out.sam

# Alignment finished - Output: aligned file (paired end) out.sam

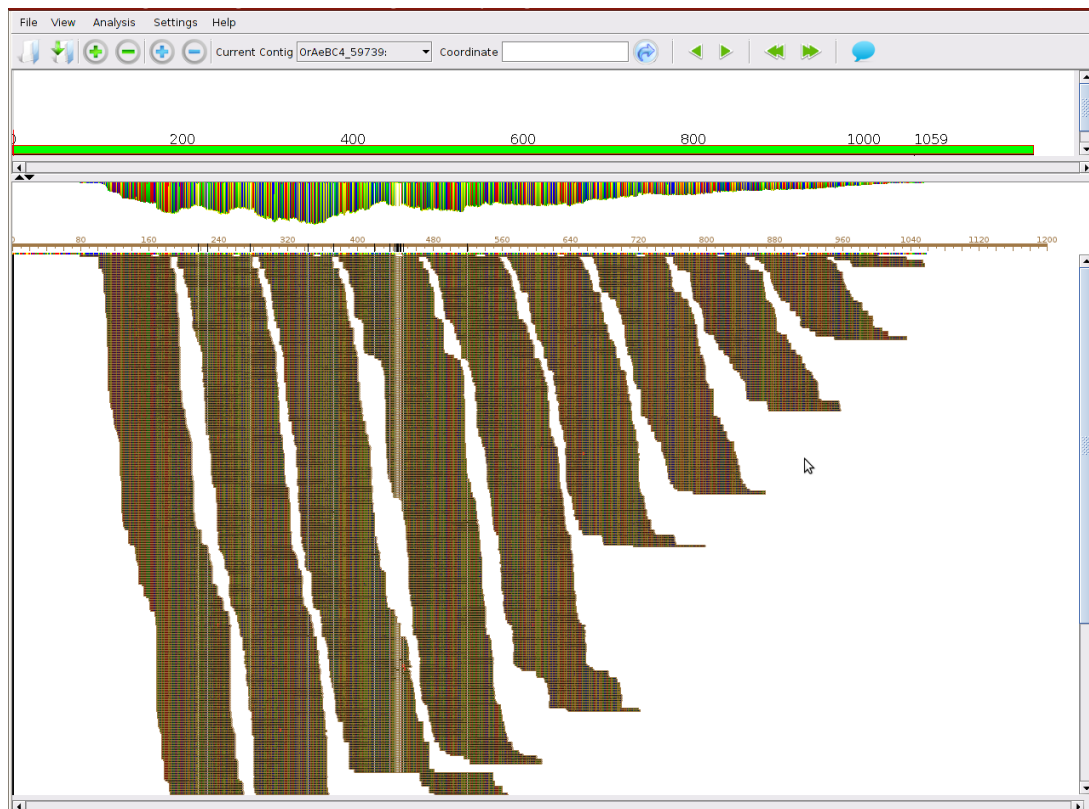
# Sorting and counting

samtools view -bS out.sam > out.bam
samtools sort out.bam out-sorted
samstat out-sorted.bam
samtools rmdup out-sorted.bam out-sorted.rmdup.bam
samstat out-sorted.rmdup.bam
samtools index out-sorted.bam
samtools index out-sorted.rmdup.bam
samtools idxstats out-sorted.bam > idxstats.txt
```

Das Skript war in dieser Form für die Nutzung von zwei CPU-Threads optimiert und benötigte für die Ausführung auf einem entsprechenden Dual Core Rechner je nach Größe und Qualität des Datensatzes ungefähr 6-12 Stunden. Die Zwischenergebnisse der einzelnen Programmschritte wurden hier zur nachträglichen Kontrolle in Dateien ausgegeben. Eine Beschleunigung ließe sich wahrscheinlich mittels Pipe-Operator erreichen, da viele der verwendeten Programme Zeile für Zeile lesend und schreibend durch die fasta/fastq Dateien gehen. Eine vom ersten Programm verarbeitete Zeile könnte so anstelle des Zwischenschritts über die Festplatte und dem damit verbundenen Abarbeiten der gesamten Datei direkt ans nächste Programm übergeben werden. Da moderne CPUs zumeist mehrere Threads gleichzeitig ausführen können, ließe sich, unter Inkaufnahme eines Verlustes der Überprüfbarkeit der Zwischenschritte, der Durchsatz entsprechend steigern.

## V Material und Methoden

Mittels SAMtools konnten einzelne contigs von Phelipanche- oder Arabidopsis-cDNAs der Referenz sowie die zugeordneten Illumina-Sequenzen aus dem Gesamtalignment isoliert und in eine eigene Datei gespeichert werden. Somit wurde eine visuelle Überprüfung des Alignments möglich. Hierzu wurde das Programm MagicViewer (<http://bioinformatics.zj.cn/magicviewer/index.php>) verwendet (Abb. 24). Das Programm ermöglicht die Beurteilung des Alignments einzelner reads als auch deren Extraktion für eine genauere Analyse.



**Abbildung 24**

Darstellung eines Alignments von reads an ein contig mittels MagicViewer:

Die Abbildung stellt beispielhaft das Alignment an ein contig aus dem Assembly des Parasitic Plant Genome Project dar. Der grüne, mit 200 bis 1059 bezifferte Balken zeigt eine Übersicht über die gesamte Länge des contigs. Die Höhe der Balken in der Mitte repräsentiert farbcodiert in grün, blau, rot und gelb die Anzahl der verschiedenen, der jeweilige Position zugeordneten Basen. Der größte, untere Teil wird von den zugeordneten reads selbst eingenommen.

Wie die weissen Streifen zwischen 400 und 600 bp in Abbildung 7 zeigen, können mittels des MagicViewers auch immer wieder kehrende Gaps im Alignment von reads auf die Referenzsequenz ausgemacht werden. Dies könnte z.B. auf Fehler in der Referenzsequenz zurückzuführen sein.

### 1.6.4 Zählen der reads in den Alignments

Für die Ermittlung der Gesamtzahl von reads, welche dem jeweiligen contig zugeordnet werden konnten, wurde ein Python-Skript geschrieben, welches auf dem Pythonmodul pysam (<http://code.google.com/p/pysam/>) aufbaut.

Python Skript für das Zählen der reads:

```
import pysam, string
f = open('/home/user-ka/oroseq/ppgpsequencescysprot/orob.txt', 'r')
h = open('reads.txt', 'a')
z = 0
y = ('')
for line in f:
    t = line.rstrip()
    samfile = pysam.Samfile("/home/user-ka/oroseq/OrAe1G_reads/inputmergedtrimclean-sorted.bam",
"rb" )
    iter = samfile.fetch( t )
    for x in iter: z = z + 1
    y = str(z)
    h.write(t)
    h.write(' ')
    h.write(y)
    h.write('\n')
    z = 0
    samfile.close()
f.closed
h.closed
```

Das Skript geht Zeile für Zeile durch eine Referenzdatei, in der zuvor die Namen der contigs gespeichert wurden, für die man die Anzahl der reads bestimmen will, welche zugeordnet wurden. Mit jeder Zeile wird die Alignment-Datei geöffnet, dort das contig aus der momentan aktuellen Zeile der Referenzdatei gesucht und die dort zugeordneten reads gezählt. Name des contigs und gezählte reads werden dann in eine Zeile einer neuen Datei geschrieben.

In der Referenzdatei stehen die Namen sämtlicher Sequenzen, welche auch schon für den Alignmentprozess verwendet wurden, also die jeweiligen Bezeichnungen für die contigs im Phelipanchetranskriptom und die Namen der fasta-Sequenzen aus der cDNA-Bank von *Arabidopsis*. Die Ausgabedatei enthält daher nach einem Durchlauf des Skriptes eine Liste dieser Sequenznamen mit der Anzahl der reads, welche jeder einzelnen Sequenz zugeordnet werden konnten.

Die Datei wurde zur genaueren Analyse in das Programm MS Excel importiert und dort zum einen die Gesamtzahl der zugeordneten reads für das Phelipanche- und das Arabidopsistranskriptom bestimmt. Des Weiteren konnten aus dieser Datei die contigs und Anzahl zugeordneter reads von Sequenzen mit Ähnlichkeit zum Cuscutain extrahiert werden.

## V Material und Methoden

Da für die Sequenzierungen der verschiedenen Gewebe unterschiedlich viele reads dem Transkriptom zugeordnet werden konnten, musste für die Bestimmung der jeweiligen Expressionslevel eine Normierung durchgeführt werden. Daher wurde für jedes Entwicklungsstadium die Anzahl der reads, die einer Einzelsequenz zugeordnet wurden, durch die Gesamtzahl der ans gesamte Phelipanchetranskriptom gebundenen reads dividiert und mit einer Mio. multipliziert. Auf diese Weise erhielt man die Anzahl der einer bestimmten Sequenz zugeordneten reads / Mio. insgesamt zugeordneter reads.

$$a * \frac{1.000.000}{A} = b$$

$a$  = Anzahl der einem bestimmten Transkript zugeordneten Sequenzen;

$A$  = Anzahl der dem gesamten Phelipanchetranskriptom zugeordneten reads

$b$  = Anzahl der einem bestimmten Transkript zugeordneten Sequenzen pro  $10^6$  reads

### 1.6.5 Elektronische Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung sowie die grafische Darstellung der Daten erfolgten mit den Tabellenkalkulationsprogrammen Gnumeric 1.10.14 sowie MS-Excel2007.

## VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten zwei Charakteristika aus der Interaktion zwischen der parasitären Pflanze *Cuscuta reflexa* und ihrem Wirt *Solanum lycopersicum* auf ihre Übertragbarkeit auf den Parasiten *Phelipanche aegyptiaca* hin untersucht werden. Beide parasitären Pflanzen sind für landwirtschaftliche Schäden verantwortlich. Ziel war eine biotechnologische Anwendung zur Verringerung der Infektionsraten durch *P. aegyptiaca*.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der attAGP-Promotor aus *S. lycopersicum* nicht nur wie bereits bekannt durch *C. reflexa* induzieren lässt sondern auch durch *P. aegyptiaca*. Mittels eines Konstrukts aus attAGP-Promotor und GUS-Reporter gen konnte die Induzierbarkeit des Promotors durch die Phytohormone Auxin und Salicylsäure festgestellt werden. Bei der Infektion durch *Cuscuta* spielen dabei vermutlich beide Faktoren eine Rolle, während bei *Phelipanche* wahrscheinlich Auxin ausschlaggebend ist.

Desweiteren wurden durch Assemblieren eines Transkriptoms aus *next generation sequencing*-Daten von *P. aegyptiaca* mRNA Sequenzen ermittelt, welche hohe Ähnlichkeiten zur Cysteinprotease Cuscutain aus *C. reflexa* haben. Die auf diesen Sequenzen basierende Expressionsanalyse zeigte eine Hochregulierung während der ersten Entwicklungsstadien von *P. aegyptiaca* bis zum Kontakt mit der Wirtspflanze an.

Zur Prüfung einer biotechnologischen Anwendung wurden Konstrukte in Tabak transformiert, welche eine DNA-Sequenz enthielten die für das PrePropeptid des Cuscutains kodiert. Auf diese Weise wurde der natürliche Inhibitor des Cuscutains in der Wirtspflanze exprimiert. Gesteuert wurde die Expression in einem Konstrukt durch den attAGP-Promotor und im anderen durch den 35S-Promotor. Gegenüber *C. reflexa* zeigten mit dem 35S-PrePropeptid-Konstrukt transformierte Pflanzen widersprüchliche Ergebnisse auf die Infektionsrate. Jedoch wurden transformierte Pflanzen in allen Versuchen seltener durch *P. aegyptiaca* befallen, wobei das 35S-Konstrukt einen besseren Schutz bot als jenes mit dem attAGP-Promotor und signifikant geringere Infektionsraten zur Folge hatte. Bei Beobachtung im *in vitro polybag*-System konnte festgestellt werden, dass sich nur beim Beginn der Infektion Unterschiede zwischen transformiertem und nicht transformiertem Tabak ergeben. Dies und die Expressionsanalyse legen nahe, dass die Cysteinprotease in *P. aegyptiaca* zu Beginn der Infektion für die Hydrolyse von Abwehrproteinen in der Zellwand des Wirtes verantwortlich sein könnte. Der mittels der Konstrukte exprimierte Inhibitor hatte somit vermutlich eine schützende Funktion.

## **VI Zusammenfassung**

Die Ergebnisse zeigen, dass sich abseits der bereits bekannten Übereinstimmungen weitere konvergente Entwicklungen zwischen parasitären Pflanzen als auch der Reaktion ihrer Wirte auf diese finden. Eine dahingehende Überprüfung auf Übertragbarkeit kann sich daher aus biotechnologischer Sicht lohnen.

## VII. Literatur

Albert, M., 2005. Studien zur Interaktion des pflanzlichen Parasiten *Cuscuta reflexa* mit dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*. Dissertation. Technische Universität Darmstadt. Available at: <http://elib.tu-darmstadt.de/diss/000629> [Accessed November 9, 2011].

Albert, M., Belastegui-Macadam, X. & Kaldenhoff, R., 2006. An attack of the plant parasite *Cuscuta reflexa* induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. *Plant Journal*, 48(4), pp.548–556.

Altschul, S.F. et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp.3389–3402.

Aly, R. et al., 2001. Broomrape (*Orobancha cumana*) Control in Sunflower (*Helianthus annuus*) with Imazapic. *Weed Technology*, 15, pp.306–309.

Aly, R. et al., 2009. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobancha aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal*, 7(6), pp.487–498.

Baldev, B., 1962. *In Vitro Studies* of Floral Induction on Stem Apices of *Cuscuta reflexa* Roxb. -A Short-day Plant. *Annals of Botany*, 26(2), pp.173–174.

Barkman, T. et al., 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), p.248.

Bar-Nun, N., Sachs, T. & Mayer, A., 2008. A role for IAA in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobancha aegyptiaca*. *Annals of Botany*, 101(2), pp.261–265.

Bertani, G., 1951. Studies on Lysogenesis I. *Journal of Bacteriology*, 62(3), pp.293–300.

Birnboim, H., 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100, pp.243–255.

Birnboim, H. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp.1513–1523.

Birschwilks, M. et al., 2006. Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), pp.911–921.



## VII Literatur

Blankenberg, D. et al., 2010. Galaxy: A Web-Based Genome Analysis Tool for Experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology*, 19.10.

Bleischwitz, M. et al., 2010. Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions. *BMC Plant Biology*, 10(1), p.227.

Borsics, T. et al., 2002. Methods for genetic transformation of the parasitic weed dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs) and for PCR-based detection of early transformation events. *Plant Science*, 162(2), pp.193–199.

Boysen-Jensen, P., 1913. Über die Leitung des phototropischen Reizes in der Avenakoleoptile. *Ber Dtsch Bot Ges*, 31, pp.559–566.

Daws, M., Pritchard, H. & Vanstaden, J., 2008. Butenolide from plant-derived smoke functions as a strigolactone analogue: Evidence from parasitic weed seed germination. *South African Journal of Botany*, 74(1), pp.116–120.

Dor, E. et al., 2010. Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Euphytica*, 171(3), pp.371–380.

Echevarría-Zomeño, S. et al., 2006. Pre-Haustorial Resistance to Broomrape (*Orobanche Cumana*) in Sunflower (*Helianthus Annuus*): Cytochemical Studies. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), pp.4189–4200.

Ehleringer, J.R. et al., 1985. Xylem-Tapping Mistletoes: Water or Nutrient Parasites? *Science*, 227(4693), pp.1479–1481.

Eizenberg, H., Colquhoun, J. & Mallory-Smith, C., 2005. A predictive degree-days model for small broomrape (*Orobanche minor*) parasitism in red clover in Oregon. *Weed Science*, 53(1), pp.37–40.

Fampa, P., Santos, A.L.S. & Ramirez, M.I., 2010. *Trypanosoma cruzi*: ubiquity expression of surface cruzipain molecules in TCI and TCII field isolates. *Parasitology Research*, 107(2), pp.443–447.

Fernández-Aparicio, Mónica et al., 2011. Transformation and regeneration of the holoparasitic plant *Phelipanche aegyptiaca*. *Plant Methods*, 7(1), p.36.

Ferrari, S. et al., 2006. Antisense Expression of the *Arabidopsis thaliana* *AtPGIP1* Gene Reduces Polygalacturonase-Inhibiting Protein Accumulation and Enhances Susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, pp.931–936.

Gaffney, T. et al., 1993. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science*, 261(5122), pp.754–756.

## VII Literatur

Gao, M. & Showalter, A., 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal*, 19(3), pp.321–331.

Gaspar, Y.M. et al., 2004. Characterization of the *Arabidopsis* Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein AtAGP17 Mutant (*rat1*) That Results in a Decreased Efficiency of *Agrobacterium* Transformation. *Plant Physiology*, 135(4), pp.2162 – 2171.

Goldwasser, Y. et al., 1999. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(3–4), pp.87–96.

Goldwasser, Y. et al., 2003. Control of *Orobanche crenata* and *Orobanche aegyptiaca* in parsley. *Crop Protection*, 22(2), pp.295–305.

Goujon, M. et al., 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), pp.W695–W699.

Grabherr, M.G. et al., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), pp.644–652.

Griffitts, A., Cramer, C. & Westwood, J., 2004. Host gene expression in response to Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca*). *Weed Science*, 52(5), pp.697–703.

Hamamouch, N. et al., 2005. A peptide from insects protects transgenic tobacco from a parasitic weed. *Transgenic Research*, 14(3), pp.227–236.

Herget, T., Schell, J. & Schreier, P.H., 1990. Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*. *Molecular and General Genetics MGG*, 224(3), pp.469–476.

Hiraoka, Y., Ueda, H. & Sugimoto, Y., 2009. Molecular responses of *Lotus japonicus* to parasitism by the compatible species *Orobanche aegyptiaca* and the incompatible species *Striga hermonthica*. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), pp.641–650.

Hofgen, R. & Willmitzer, L., 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 16(20), p.9877.

Horsch, R. et al., 1985. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science*, 227(4691), pp.1229–1231.

Joel, D. et al., 1995. Transgenic crops against parasites. *Nature*, 374(6519), pp.220–221.

## VII Literatur

- Keyes et al., 2000. Signaling Organogenesis in Parasitic Angiosperms: Xenognosin Generation, Perception, and Response. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), pp.217–231.
- Kgosi, R.L. et al., 2012. Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga* spp. in soil. *Weed Research*, 52(3), pp.197–203.
- Kim, D. et al., 1998. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chemistry & Biology*, 5(2), pp.103–117.
- Kohlschmid, E., Sauerborn, J. & Müller-stöver, D., 2009. Impact of *Fusarium oxysporum* on the holoparasitic weed *Phelipanche ramosa*: biocontrol efficacy under field-grown conditions. *Weed Research*, 49, pp.56–65.
- Kollmann, R. & Dörr, I., 1987. Parasitische Blütenpflanzen. *Naturwissenschaften*, 74(1), pp.12–21.
- Kondo, Y. et al., 2007. Synthesis and seed germination stimulating activity of some imino analogs of strigolactones. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 71(11), pp.2781–2786.
- van der Kooij, T. et al., 2000. Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta*, 210(5), pp.701–707.
- Kusumoto, D. et al., 2007. Resistance of Red Clover (*Trifolium pratense*) to the Root Parasitic Plant *Orobancha minor* is Activated by Salicylate but not by Jasmonate. *Annals of Botany*, 100(3), pp.537–544.
- Li, D. et al., 2009. Identification of genes differentially expressed in *Mikania micrantha* during *Cuscuta campestris* infection by suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology*, 166(13), pp.1423–1435.
- Linke, K.-H., Vorlaender, C. & Saxena, M.C., 1990. Occurrence and impact of *Phytomyza orobanchia* [Diptera: Agromyzidae] on *Orobancha crenata* [Orobanchaceae] in Syria. *Entomophaga*, 35(4), pp.633–639.
- Löffler, C., Czygan, F.C. & Proksch, P., 1999. Role of Indole-3-acetic Acid in the Interaction of the Phanerogamic Parasite *Cuscuta* and Host Plants. *Plant Biology*, 1(6), pp.613–617.
- Losner-Goshen, D. et al., 1998. Pectolytic Activity by the Haustorium of the Parasitic Plant *Orobancha* L. (Orobanchaceae) in Host Roots. *Annals of Botany*, 81(2), pp.319–326.

## VII Literatur

- Malik, H., Rutjes, F.P.J.T. & Zwanenburg, Binne, 2010. A new efficient synthesis of GR24 and dimethyl A-ring analogues, germinating agents for seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* spp. *Tetrahedron*, 66(35), pp.7198–7203.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), pp.10–12.
- Matvienko, M. et al., 2001. Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant Journal*, 25(4), pp.375–387.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497.
- Murdock, L.L. et al., 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 87(4), pp.783–787.
- Nagar, R., Singh, M. & Sanwal, G.G., 1984. Cell Wall Degrading Enzymes in *Cuscuta reflexa* and Its Hosts. *Journal of Experimental Botany*, 35(8), pp.1104–1112.
- Parker, C. & Dixon, N., 1983. The use of polyethylene bags in the culture and study of *Striga* spp. and other organisms on crop roots. *Annals of Applied Biology*, 103(3), pp.485–488.
- Pennisi, E., 2006. Plant science - Parasitic weed uses chemical cues to find host plant. *Science*, 313(5795), pp.1867–1867.
- Petersen, T.N. et al., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth*, 8(10), pp.785–786.
- Press, M.C. et al., 1987. Carbon Isotope Ratios Demonstrate Carbon Flux from C<sub>4</sub> Host to C<sub>3</sub> Parasite. *Plant Physiology*, 85(4), pp.1143–1145.
- Reed, R.C., Brady, S.R. & Muday, G.K., 1998. Inhibition of Auxin Movement from the Shoot into the Root Inhibits Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 118(4), pp.1369–1378.
- Roney, J., 2007. Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder. *Plant Physiology*, 143(2), pp.1037–1043.
- Rowntree, R.A. & Morris, D.A., 1979. Accumulation of <sup>14</sup>C from exogenous labelled auxin in lateral root primordia of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 144(5), pp.463–466.

## VII Literatur

Runyon, J. et al., 2010. Parasitism by *Cuscuta pentagona* sequentially induces JA and SA defence pathways in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 33(2), pp.290–303.

Sambrook, J. & Russell, D.W., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. 0003 ed., Cold Spring Harbor Laboratory.

Showalter, A., 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, pp.1399–1417.

Smith, C.E. et al., 1996. A mechanism for inducing plant development: the genesis of a specific inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(14), pp.6986 –6991.

Srivastava, S. & Dwivedi, U.N., 2001. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa* - an angiospermic parasite - and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(6), pp.529–538.

Sun, C. et al., 2003. A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the *iso1* Promoter. *The Plant Cell*, 15(9), pp.2076–2092.

Suzuki, H. et al., 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220(5), pp.696–707.

Tomilov, A. et al., 2008. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *Plant Journal*, 56(3), pp.389–397.

Tomilov, A., Tomilova, Natalia & Yoder, J.I., 2004. *In Vitro* Haustorium Development in Roots and Root Cultures of the Hemiparasitic Plant *Triphysaria Versicolor*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(3), pp.257–265.

Vachev, T. et al., 2010. Trafficking of the *Potato spindle tuber viroid* between tomato and *Orobanche ramosa*. *Virology*, 399(2), pp.187–193.

Veronesi, C. et al., 2007. Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia Plantarum*, 51(2), pp.391–394.

Vieira Dos Santos, C. et al., 2003. Defense Gene Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology*, 93(4), pp.451–457.

Wegmann, K., 1999. Die Orobanche und Möglichkeiten der Bekämpfung im deutschen Tabakanbau. *Der deutsche Tabakbau*, 78, pp.11–13.

## VII Literatur

Went, F., 1928. Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. trav. Bot. neer.*, 25, pp.1–116.

Westwood, J. et al., 2012. The Parasitic Plant Genome Project: New Tools for Understanding the Biology of Orobanche and Striga. *Weed Science*, 60(2), pp.295–306.

Wilkins, T. & Smart, L., 1996. *A laboratory guide to RNA: isolation, analysis, and synthesis*, Wiley-IEEE.

Yoneyama, K. et al., 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta*, 227(1), pp.125–132.

Yoneyama, K. et al., 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist*, 179(2), pp.484–494.

Yoshida, S. et al., 2010. Horizontal Gene Transfer by the Parasitic Plant *Striga hermonthica*. *Science*, 328(5982), p.1128.

Zhang, Y. et al., 2003. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Molecular Biology*, 52(1), pp.91–102.

## VIII. Anhang

### Liste der Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
attAGP	Attachment Arabinogalaktanprotein
cDNA	Copy-DNA
DAI	Days after induction; Tage nach der Keimungsinduktion mit GR24
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IAA	Indole-3-acetic acid; Indol-3-essigsäure
mRNA	Messenger RNA
MS-Medium	Murashige & Skoog Medium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NAA	1-Naphthaleneacetic acid; 1-Naphthylessigsäure
kB	Kilobasenpaare
ÜN	Über Nacht
ori	Origin of replication; Replikationsursprung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PPGP	Parasitic Plant Genome Project
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indonyl- $\beta$ -D-glucuronsäure, Cyclohexylammoniumsalz

## VIII Anhang

Sequenz des längsten mit Trinity assemblierten Transkriptes mit Ähnlichkeiten zu einer Cysteinprotease (Orobanche1). Fett unterlegt ist der größte zusammenhängende *open reading frame*.

**CTCCCAA**ACTCTCCTCGCCAACGATGCCTCCTTTCTCTCTCCTCTATCTTCTCCCCCTCGCTCT  
**CCTATCCTCTGCACTCGCGTCCACCGATGGCTTCATAGACACTCTGACCGAAGATCCTCTG**  
**ATCCGGCAGGTCGTGTCCGACGGCGTCGAGGCGGTCGATCATTGCTGCACGCCGACCAT**  
**CACTTCTCACTGTTCAAGGCCAAGTACGGGAAGACGTACGCCACCCAGGAGGAGCACGA**  
**CCACAGATTCTCGGTCTTCAAGGCTAACCTGCGCCGCTCGAAGCGCCACCAGCTGCTCGA**  
**TCCCTCCGCCGTCCACGGCGTCACGAAATTCTCTGATTTGACCCCCGACGAGTTCGAGAA**  
**GAGCTACCTGGGGCTCCACAAGAGGCGTCTGAAGCTTCCGGTGGACGCGCACAAGGCGC**  
**CGTTTCTGCCTACTAACGATCTACCGACGGACTTTGACTGGCGAGATCACGGAGCCGTTA**  
**CCGCCGTTAAAGATCAGGGATCTTGTGGGTCGTGCTGGTCGTTTAGTACAACCGGGGCA**  
**CTGGAAGGAGCAA**ACTATCTTGCTACTGGGAAGCTCGTGAGCTTAAGCGAGCAGCAGCT  
**TGTGGATTGTGATCATGAGT**CGATCCGGATGAACATGATTCATGTGATGCAGGGTGTG  
**ATGGTGGACTGATGAACAATGCCTTTGAATACACTCTCAAGGTCGGCGGACTTCAAAAG**  
**GAGAAAGATTATCCTTACACCGGGACTGATGGCGTCTGCAAATTCGATAAAAGCAA**AAT  
**TGCAGCTTCAGTATCGAACTTCAGCGTTGTCTCCTTAGATGATGACCAGATTGCTGCAA**AAT  
**CTGGTTAATTACGGCCCTCTTGCA**GTGGGAATCAATGCGGCTTGGATGCAAACGTACATC  
**GGAGGAGTCTCATGTCCTTACGTTTGCGGGAAACATCTGGATCACGGTGTTCCTAGTG**  
**GGATACGGTGGATCAGGATATGCTCCTATT**CGTCTTAAGGACAAGCCTTACTGGATCATT  
**AAGAATT**CGTGGGGTGAAAGCTGGGGAGAAAATGGATATTATAAGATCTGCAGGGGGCC  
**GTAATGTTTGTGGGGTGGAGTCGATGGTCTCAACTGTGAACGCGGCCACGTTACTTCTG**  
**AGTAA**TTTTATCTAGCAACAAGTTTTAATGGAAGTGGCTGGTTGCTGTAATATGTGTGTATA  
TGACTCGTGTAATAAGAAGTGCTTCCATATGTATTTTAAAAGCCAAATGGCCAGTAATTA  
GCTCGACGGAGCTCTTTAGGTTATTATTATTAACTGTCCCAAGGTGAACTGGGATGTG  
GTTTGCTTGTAACCTTTACATGTTTGTGATGTTTATAGATGCATTATGTTACGAGGCTTTTATTG  
ATGTATTGTACTGTCAGAACTCTTGAATACTTATCTGAAGAAATATTTGCGCTTCTAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAACA



## VIII Anhang

### Primer-Liste

Cys-prepro\_for: Primer für Gateway Rekombination der PrePro-Sequenz in pMDC32, beinhaltet die Rekombinationssequenzen (attB-sites) und die n-terminale Sequenz der cDNA des PrePropeptides

5`GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCTCCCGTCA  
GATTCGATTGG 3`

Cysprepro\_rev: Primer für Gateway Rekombination der PrePro-Sequenz in pMDC32, beinhaltet die Rekombinationssequenzen (attB-sites) und die reverse c-terminale Sequenz der cDNA des PrePropeptides

5`GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCGTCGGTGGGAAGGGTGG 3`

AGPGus-prom fw HindIII: Forward primer, beinhaltet die Restriktionsschnittstelle HindIII und einen Teil der 5'-Sequenz des attAGP-Promotors

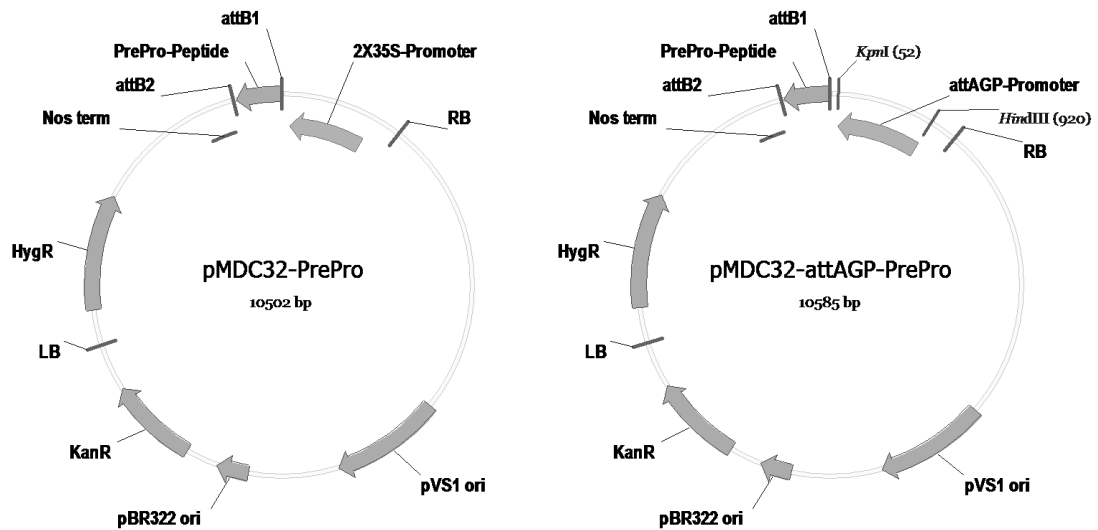
5`CTAAGCTTACTATAGGGCACGCGTGGTC 3`

attAGP-prom KpnI rev: Forward primer, beinhaltet die Restriktionsschnittstelle KpnI und einen Teil der 3'-Sequenz des attAGP-Promotors

5'-AAAGGTACCGAGGAAGTTTGTATTCTGTAGGTATTGTAAAG-3'

## VIII Anhang

Plasmide:



Verwendete Plasmidvektoren auf Basis von pMDC32:

pBR322 / pVS1 ori: ori für Vermehrung in *E. coli* / *A. tumefaciens*; KanR: Kanamycinresistenz für Selektion in Bakterien; HygR: Hygromycinresistenz für Selektion in Pflanzen; LB / RB: Left / Right border Sequenzen für Rekombination des Konstrukts in das Pflanzengenom durch *A. tumefaciens*; Nos term: Nopaline Synthetase Terminator Sequenz; attB1/2: Rekombinationssequenzen für Gateway Klonierung; PrePropeptide: Kodierende Sequenz des PrePropeptides; 2x35S-Promoter, attAGP-Promoter: 35S- und attAGP-Promotor

Publikation und Posterpräsentation

Rehker, J., Lachnit, M. & Kaldenhoff, R., Molecular convergence of the parasitic plant species *Cuscuta reflexa* and *Phelipanche aegyptiaca*. *Planta*, 236(2), pp.557–566.

10th World Congress on Parasitic Plants, Kusadasi, Turkey, 2009. Creation of *Cuscuta* resistant plants by application or expression of a cysteine protease inhibitor.

11th World Congress on Parasitic Plants, Martina Franca, Italy, 2011. Recognition of parasitic plants by their hosts and engineered resistance in tobacco using recombinant Promoter-Inhibitor constructs.

## Danksagung

Ich danke insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen und die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha für die Begutachtung der Arbeit.

Dr. Marc Bleischwitz für die schnelle Einarbeitung in das Forschungsgebiet.

Dr. Radi Aly und Dr. Yaakov Goldwasser für den anregenden Austausch von Material und Informationen, die hilfreichen Tipps bei der Etablierung des *in vitro polybag*-Systems und nicht zuletzt die inspirierenden Unterhaltungen in Kuşadasi und Martina Franca.

Allen Beteiligten des Parasitic Plant Genome Project insbesondere Jim Westwood für das Bereitstellen der Sequenzinformationen.

Magdalena Lachnit, Joanna Urban und Beate Otto für die Diskussionen über gemeinsame Forschungsinteressen und Arbeitsmethoden.

Henrik Sperling für die konstruktive Kritik an bioinformatischen und experimentellen Vorgehensweisen.

Dr. Marlies Heckwolf für das Bescheid wissen in allen Dingen.

Dr. Norbert Uehlein-Rössner für seine Ingenieursleistungen im Labor.

Nadine Priem, Dr. Muhammad Ayaz und Dr. Sven Sdorra für die Gesellschaft im Labor an Tagen mit stark verlängerten Arbeitszeiten.

Allen weiteren ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Kaldenhoff für die gute Zusammenarbeit.

Et hät noch emmer joot jejange.

## **Lebenslauf**

Schulische Bildung:

1984-1988:

Grundschule Geilenkircher Str. Köln

1988-1997:

Apostelgymnasium Köln; Abschluss: Abitur

Studium:

Oktober 1997 – September 2007

Studium der Biologie an der rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zu Transformationen und Genexpressionen in embryogenen Kulturen der Lärche (*Larix decidua* sp.)“.

April 2008 – Dezember 2012

Promotionsstudium am Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Datum der Abgabe      Unterschrift